



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"RESPUESTA DE CITOCINAS Y DETERMINACION DE APOPTOSIS EN RATONES REINFECTADOS CON *TRYPANOSOMA CRUZI*"

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 :
LORENA GOMEZ GARCIA



DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR MANUEL MONTEON PADILLA





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.



ERADAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
efa de la División de Estudios Profesionales de la
'acultad de Ciencias
resente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Respuesta de citocinas y determinación de apoptosis en ratones
reinfectedos con Trypanosoma cruzi"

Realizado por Lorena Gómez García

en número de cuenta 9320984-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Víctor Manuel Monteón Padilla

Ul. Monteón

Propietario

Dra. María Antonieta Aladro Lubel

M. A. Aladro Lubel

Propietario

Dr. Guillermo Salgado Maldonado

Guillermo Salgado Maldonado

Suplente

Biol. Julio Prieto Sagredo

Julio Prieto Sagredo

Suplente

M. en Biol. Exp. David Cruz Robles

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

[Firma]



Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Generalidades	2
1.2. Distribución geográfica	2
1.3. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.4. Clínica de la enfermedad de Chagas	4
2 ANTECEDENTES	6
2.1. Respuesta inmunológica en la enfermedad de Chagas	6
2.2. Participación de la citocinas en la enfermedad de Chagas	8
2.3. Inmunosupresión en la enfermedad de Chagas	15
2.4. Apoptosis en enfermedad de Chagas	17
3 HIPÓTESIS	20
4 OBJETIVOS	22
5 MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Obtención de parásitos	24
5.2. Inoculación de animales	24
5.3. Disecciones	25
5.4. Detección <i>T. cruzi</i> en sangre periférica (observación directa)	25

5.5. Extracción de DNA	26
5.6. Extracción de RNA	27
5.7. Síntesis de cDNA	28
5.8. Detección de DNA de <i>T. cruzi</i> por PCR	28
5.9. Detección de mRNA de citocinas por RT-PCR	30
5.9.1 Electroforesis	32
5.9.2 Semicuantificación de citocinas	33
5.9.3 Determinación del proceso inflamatorio	33
5.9.4 Determinación de presencia de apoptosis	34
5.9.5 Diagrama de Flujo de Procedimientos Experimentales	35
6 RESULTADOS	36
6.1. Detección de <i>T. cruzi</i> en sangre periférica	36
6.2. Detección de <i>T. cruzi</i> en piel y ganglio	39
6.3. Detección de RNAm de citocinas en piel y ganglio	40
6.4 Semicuantificación de citocinas	45
6.5. Determinación del proceso inflamatorio en piel y ganglio	47
6.6. Determinación de presencia de apoptosis en piel y ganglio	51
7 DISCUSIÓN	61
8 CONCLUSIONES	69
9 LITERATURA CITADA	70

Agradezco al Dr. Víctor Monteón Padilla, al Dr. Pedro A. Reyes López y al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por el apoyo recibido a lo largo de la realización de este proyecto.

Lista de Abreviaturas

BCIP	bromochloroindolyl phosphate
CD3	Complejo polipeptídico asociado al receptor de las células T
CD4	Glicoproteína que sirve como cooreceptor en células T restringidas a moléculas MHC II
CD8	Proteína dimérica que sirve como cooreceptor en células T restringidas a moléculas MHC I
CD95	Proteína de membrana que se expresa constitutivamente en linfocitos T y B activados (Fas)
CD4+	Células T que presentan en su superficie a la molécula CD4
CD8+	Células T que presentan en su superficie a la molécula CD8
DEPC	diethylpyrocarbonate
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP ^s	deoxinucleótidos
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
Fas	Proteína de membrana que se expresa constitutivamente en linfocitos T y B activados (CD95)
FasL	Proteína transmembranal que se expresa en diversos tejidos como bazo, timo y pulmón
g ^{°s}	gravedades
IFN- γ	interferón-gama
IL-2	interleucina-dos
IL-4	interleucina-cuatro
IL-6	interleucina-seis
IL-10	interleucina-diez
IL-12	interleucina-doce
iNOS	inducible oxide nitric sintase

KNS2	oligonucleótido sentido que amplifica una porción del cinetoplasto de <i>T. cruzi</i>
KNS2	oligonucleótido antisentido que amplifica una porción del cinetoplasto de <i>T. cruzi</i>
LT	lymphotoxine
MHC	major histocompatibility complex
NBT	nitro blue tetrazolium
NK	natural killer cell
nm	nanómetros
NO	nitric oxide
NP-40	Nonidet P40
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
TBE	Tris-Borato-EDTA
Tc	T citotoxic cell
TGF- β	transforming growth factor-beta
Th1	Respuesta que produce citocinas que promueven inflamación y respuestas celulares
Th2	Respuesta que produce citocinas antagónicas a las de la respuesta Th1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alfa
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
U.D.O	Unidad de Densidad Óptica

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un parásito hemoflagelado que infecta tanto humanos como mamíferos domésticos y salvajes. La infección con este parásito, al igual que en la mayoría de los estímulos antigénicos, provoca en el hospedero una respuesta inmune tanto celular como humoral, que depende y está regulada en gran parte a través de la síntesis diferencial de algunas citocinas. Esta respuesta inmune inducida es incapaz de controlar totalmente la replicación del parásito, hecho que se deriva en el desarrollo de la infección. Dicha incapacidad del sistema inmune del hospedero se debe en parte a mecanismos de inmunosupresión generados durante la infección. Recientemente se ha propuesto que uno de los mecanismos a través de los cuáles se genera esta inmunosupresión, es la entrada de células de la respuesta inmune en apoptosis.

Por otro lado, los individuos pertenecientes a zonas endémicas de la enfermedad, se encuentran continuamente expuestos al parásito, con lo cuál las reinfecciones son frecuentes.

En el presente trabajo se determinó en el sitio de inoculación y en el ganglio próximo a este el perfil de citocinas que se presenta en ratones re infectados con *Trypanosoma cruzi* a través de RT-PCR, así como la presencia de células en apoptosis en los mismos tejidos con el ensayo de TUNEL.

Se encontró que existe una respuesta pobre de citocinas en animales re infectados con *T. cruzi*, tanto en el sitio de inoculación como en el ganglio regional, además de células de la respuesta inmune en estado apoptótico.

Se concluye que los ratones re infectados con *Trypanosoma cruzi* pueden presentar inmunosupresión por al menos dos mecanismos, producción baja de citocinas y entrada de células en apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La enfermedad de Chagas o Tripanosomosis americana, es una infección causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, la cuál produce una intensa reacción inflamatoria que a su vez afecta diversos tejidos, principalmente muscular y nervioso.

La Organización Mundial de la Salud, estima que existen de 16 a 18 millones de personas infectadas en el Continente Americano y que aproximadamente de 2 a 3 millones de éstas, desarrollarán la fase crónica de la enfermedad. Por esto, la enfermedad de Chagas, es considerada como un problema importante de salud pública en Latinoamérica (1).

Distribución geográfica

Hasta hoy en día, se sabe que la enfermedad de Chagas se encuentra confinada exclusivamente al Continente Americano. Inicialmente se pensó que era una enfermedad restringida a Brasil, pero estudios posteriores demostraron que su distribución era mucho más extensa, ya que existen individuos afectados en Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, México y Estados Unidos (2).

En México, se han registrado casos en casi todo el país, siendo Guerrero, Oaxaca y Chiapas, los estados con mayor número de casos. Es importante hacer notar, que la poca difusión y conocimiento que se tiene de la enfermedad, son factores que influyen en la baja detección que se hace de la misma (3).

Ciclo de vida

Como se mencionó anteriormente, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el parásito *Trypanosoma cruzi*, este parásito posee un ciclo de vida complejo, ya que necesita de un hospedero definitivo (animales homeotermos específicamente mamíferos) y de un hospedero intermediario o vector (artrópodos hemípteros pertenecientes a la familia Reduviidae) (2).

Dependiendo del microambiente en el cuál el parásito se encuentre, tendrá una de cuatro formas: amastigotes, epimastigotes, tripomastigotes sanguíneos y tripomastigotes metacíclicos (fase infectante para el mamífero).

El vector reduído llega a ser infectado por ingestión de 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; este al alimentarse del organismo homeotermo, excreta las formas infecciosas de *T. cruzi* (tripomastigotes metacíclicos), las cuáles a su vez, a través de alguna abrasión en la piel o a través de las mucosas, penetran en el organismo infectándolo. Los tripomastigotes comienzan a migrar del sitio de entrada por medio del torrente sanguíneo y vía linfática, lo que produce un estado septicémico con una dispersión extensiva del parásito, invadiendo preferencialmente células musculares, en donde es posible detectarlos una semana después de la infección (4). Una vez dentro de las células, el tripomastigote se transforma en amastigote y se multiplica por fisión binaria, lo cuál culmina con la lisis celular. Estos amastigotes se transforman en tripomastigotes sanguíneos y entran a la circulación para infectar otras células y así perpetuar la infección dentro del hospedero.

Clínica de la Enfermedad de Chagas.

Se reconocen tres formas clínicas o fases de la enfermedad de Chagas:

Fase aguda. De corta duración, generalmente que va de pocos días hasta 5 semanas. En esta fase se detectan numerosos parásitos circulantes y en algunos casos existe sintomatología, la cuál comprende fiebre elevada, malestar general, anorexia, edema facial y de extremidades inferiores, en ocasiones vómito, diarrea, linfadenopatía generalizada y hepatoesplenomegalia moderada; síntomas que en su mayoría ceden después de 4 a 8 semanas (5). El sitio de entrada del parásito puede ser reconocido por la formación de una zona indurada con eritema y tumefacción llamada chagoma ó por edema periorcular indoloro, conocido como signo de Romaña. En muy pocos casos puede sobrevenir la muerte en 2 a 4 semanas o el hospedero pasa a la siguiente fase.

Fase crónica indeterminada. En esta, la tripanosomosis aparenta haber desaparecido de manera espontánea, ya que se caracteriza por parasitemia asintomática y subpatente; sin embargo, un bajo nivel de parasitemia persiste, de manera que el hospedero puede permanecer así toda su vida o progresar a la fase crónica sintomática de la enfermedad.

Fase crónica sintomática. Solo aproximadamente el 30% de los individuos infectados desarrollan la forma crónica de la enfermedad, fase que solo es evidente años o incluso décadas después de la infección inicial. Sus síntomas están relacionados posiblemente con el daño sufrido durante la fase aguda. El corazón es el órgano más afectado, sufriendo alteraciones del ritmo, insuficiencia cardiaca, y tromboembolia.

La miocardiopatía que ocurre afecta muy a menudo el ventrículo derecho; esto puede ser gradual, sin embargo; una vez que se produce insuficiencia congestiva, la muerte sobreviene en cuestión de meses. En ocasiones se

presenta dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon), como resultado de la destrucción de los ganglios nerviosos autónomos que se encuentran dentro de las paredes viscerales (2, 6).

ANTECEDENTES

Respuesta Inmunológica en la Enfermedad de Chagas

Según Tizard (7), dentro de la respuesta inmunológica de resistencia del hospedero contra la enfermedad de Chagas, intervienen fundamentalmente los siguientes factores:

- a) Respuesta humoral y celular. Se ha identificado que los anticuerpos del tipo IgG2a e IgG2b , pueden transferirse a ratones no infectados y conferir resistencia; así por ejemplo, ratones con baja respuesta de anticuerpos son altamente susceptibles a la infección, al igual que los ratones deficientes de células B. Además, experimentos con ratones desnudos o deficientes en células T muestran alta susceptibilidad a la infección con el parásito; sin embargo, cuando se transfieren a estos animales timocitos inmunes o células de bazo sensibilizadas se les confiere resistencia.

- b) Resistencia genética del hospedero. La susceptibilidad y resistencia a la enfermedad varían entre las diferentes cepas de ratón. Por ejemplo, la cepas C3H/He, DBA/2 y A son altamente susceptibles a la infección, mientras que las cepas C57BL/10 Y DBA/1 son altamente resistentes. La cepa BALB/c se encuentra situada entre estos dos extremos debido a su susceptibilidad moderada (8). Algunos experimentos con ratones congénitos e híbridos F1 de animales resistentes y susceptibles indican que la resistencia está controlada primariamente por genes fuera del MHC (mayor histocompatibility complex).

- c) Destrucción de tripomastigotes mediada por complemento. Existen anticuerpos líticos que cubren al parásito circulante y por fijación de complemento lo destruyen; aparecen en fase aguda y su mantenimiento requiere de infección activa. El requerimiento de complemento se comprueba por incremento de la susceptibilidad al tratar ratones con factor de veneno de cobra que agota al complemento
- d) Citotoxicidad mediada por células a tripomastigotes metacíclicos. Por experimentos *in vitro* se ha visto que los tripomastigotes metacíclicos pueden ser lisados independientemente de complemento, por el contacto con neutrófilos, eosinófilos y células linfoides, así como por exposición a linfotóxina (LT). *In vitro*, la LT neutraliza la capacidad de los tripomastigotes para infectar células
- e) Captación y destrucción de tripomastigotes metacíclicos por macrófagos. Los macrófagos son las células de primera línea que reconocen, adhieren y fagocitan a ciertos parásitos, por mecanismos inespecíficos o mediados por anticuerpos. Los macrófagos, también son esenciales en el procesamiento y presentación de antígenos en la infección con *T. cruzi*, ya que se ha observado que la proporción de estos que expresan antígeno I-A ó moléculas clase I aumenta considerablemente durante la fase aguda de la infección.
- f) Destrucción de amastigotes mediada por células. Los amastigotes son inaccesibles a mecanismos que eliminan tripomastigotes sanguíneos dada su naturaleza intracelular, por tanto, se requiere primero de la destrucción de la célula hospedero y, en segundo lugar, una vez fuera los amastigotes, la acción de los mecanismos antes mencionados. Aunque se ha encontrado antígeno del parásito en la superficie de las

células parasitadas, se ha visto que este es mayor cuando la célula se rompe, entonces los antígenos se adhieren a células adyacentes no parasitadas y estas células son ahora susceptibles de lisis por células especializadas (linfocitos sensibilizados), evento que por tanto está implicado en la patogénesis de la enfermedad.

Es importante señalar que las diferencias genéticas entre cepas del parásito también influyen en el desarrollo de la infección, así como el tamaño de inóculo. (9)

Citocinas en la enfermedad de Chagas

La resistencia del hospedero durante la infección con *T. cruzi* en modelo murino depende de la inmunidad innata y adquirida, requiriendo esfuerzos combinados de un número importante de células, incluyendo linfocitos T CD4+, CD8+, células NK, así como de la producción de anticuerpos por células B (10).

Se han realizado numerosos estudios en cuanto al papel de las citocinas en la enfermedad de Chagas. En la mayoría se han utilizado ratones infectados artificialmente con *T. cruzi*, enfocándose en la capacidad de los linfocitos de los mismos para producir determinadas citocinas (11). En ellos se ha visto que las citocinas juegan un papel importante en la regulación de la replicación del parásito y la respuesta inmunológica del animal infectado (12), así, la patología resultante de la infección con *T. cruzi* está determinada en gran parte por las citocinas que se producen en respuesta a la infección. (13).

Niveles altos de IL-2, IL-12, IFN- γ y TNF- α , caracterizan una respuesta de tipo Th1, mientras que IL-4, IL-10 e IL-6 son secretadas durante la respuesta de tipo Th2 (14). Así, existen dos puntos importantes que se han planteado acerca de la producción de citocinas en la enfermedad: a) La resistencia a los protozoarios

parásitos intracelulares está asociada a un patrón de respuesta Th1, mientras que la susceptibilidad está ligada a una respuesta del tipo Th2; y b) Las enfermedades infecciosas crónicas tienden hacia una predominancia de un solo patrón de citocinas, ya sea Th1 ó Th2, en respuesta específica al patógeno (15).

El perfil de citocinas que se presenta en ésta enfermedad en modelo murino es pobremente entendido, a diferencia de otros microorganismos como *Leishmania*, *Toxoplasma* y *Schistosoma*, los cuáles generalmente se caracterizan por inducir un tipo de respuesta Th1 (16-18), en ninguno de los trabajos realizados en enfermedad de Chagas se ha encontrado un perfil predominante Th1 ó Th2, siendo además la producción de citocinas diferencial en el tiempo entre las distintas cepas.

De esta manera, Torrico et al (19) propusieron que el IFN- γ , es la citocina que controla el primer paso de la multiplicación del parásito debido a su acción sobre las células efectoras correspondientes que permiten el establecimiento de la respuesta inmunológica humoral y celular apropiada en el organismo.

La secreción de IFN- γ en modelo murino inicia generalmente alrededor de los 9 días después de la infección y aumenta significativamente para el día 12, aunque existe secreción de la misma por macrófagos peritoneales aproximadamente al cuarto día post-infección (13, 20-22). Esta citocina proviene de distintas fuentes, pero se ha demostrado que una de las principales son las células NK (22).

IFN- γ tiene un papel fundamental en la regulación de la sobrevivencia de parásitos internalizados en los macrófagos y en general en el curso de la infección, ya que es el responsable de la activación de macrófagos, los cuáles una vez activados son capaces de llevar a cabo la presentación de antígenos

por moléculas del MHC clase II, la liberación de productos germicidas tales como peróxido de hidrógeno y proteasas, además de expresar sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) requerida para la producción de óxido nítrico (NO) (23).

Una más de las citocinas de tipo Th1 involucradas de manera importante en la resistencia contra el parásito es la interleucina-2 ya que es uno de los principales inductores de proliferación de linfocitos T_H y T_C, así como un promotor importante de la actividad de células NK, ayudando así, a generar una respuesta inmunológica adecuada (24). Desgraciadamente, diversas observaciones muestran una capacidad reducida de las células T de animales infectados para producirla, evento que puede deberse a una alteración en la transcripción del gen correspondiente, con lo cual este parásito estaría generando una disfunción de los linfocitos (25). Otros autores sugieren que la falla de producción temprana de IL-2 en fase aguda, refleja supresión general de células Th1, probablemente mediante inducción de anergia (12) y/o por falta de la expresión de receptores para esta citocina en células T y B (26). En consecuencia, en perfiles de citocinas estudiados por distintas metodologías, es característica la falta de detección de IL-2 en esplenocitos y células linfoides (11, 25, 27-28), en células de sangre periférica y en órganos tales como corazón de animales y pacientes infectados con *T. cruzi*, mientras que la restauración exógena de la misma en ratones chagásicos regenera su respuesta inmunológica (25).

En la infección con *T. cruzi*, los tripomastigotes sanguíneos vivos y los amastigotes, inducen la síntesis de IL-12 por macrófagos, la cuál es otra de las interleucinas importantes que participan en la respuesta inmune contra la infección. Esta citocina tiene la capacidad de inducir la producción de IFN- γ , así como la proliferación de células NK y citotoxicidad mediada por linfocitos T_C, juega un papel muy importante en la diferenciación y expansión de células T

CD4+, que producen IFN- γ e IL-2, las cuáles a su vez pueden promover la respuesta de células T y activación de macrófagos. La interleucina IL-12 tiene el potencial de aumentar la respuesta inmunológica endógena contra infecciones microbianas mediante diferentes formas, incluyendo la regulación de inmunidad mediada por células, siendo la clave para la iniciación de este tipo de respuesta contra patógenos intracelulares. IL-12, es responsable de la producción temprana de IFN- γ observada durante la infección y por tanto del subsecuente control de la proliferación del parásito *in vivo* (10). Así, la administración de esta proteína tiene un efecto protector en modelo murino, mientras que el tratamiento con anticuerpos contra IL-12 incrementa la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* (29). Estos y algunos otros experimentos, sugieren que una o más funciones biológicas de la IL-12 o efectos inducidos por ella, juegan un papel esencial en la defensa, contribuyendo a la protección contra *T. cruzi* (23, 30).

Los experimentos realizados con bacterias, parásitos extra e intracelulares, hongos y virus, muestran que la IL-12 puede ser un importante regulador endógeno de las respuestas a la infección, además de tener un fuerte potencial terapéutico para promover la defensa del organismo, sin embargo; concentraciones inapropiadamente elevadas pueden contribuir a la inmunopatología mediada por citocinas (23), ya que por ejemplo, altas dosis de IL-12 resultan en la exacerbación de los infiltrados inflamatorios en el corazón (31) y muerte prematura (29)

Durante la infección experimental, se ha observado expresión más o menos constante de niveles elevados de la citocina TGF- β (transforming growth factor- β) por células esplénicas, la cuál está asociada con la regulación de la respuesta inmunológica y el control de la activación de macrófagos. TGF- β es producida por células B, T y macrófagos activados. Es reconocida como un poderoso mediador de inmunosupresión, inhibiendo la inducción del receptor para IL-2, la

proliferación de linfocitos inducida por IL-1, la proliferación y diferenciación de células B, la expresión de antígenos del MHC clase II, la generación de linfocitos T citotóxicos y la de células NK activadas por linfocinas. Debido a que tiene la capacidad de inhibir la activación de macrófagos inducida por citocinas, suprime la producción de intermediarios de nitrógeno y oxígeno reactivo producidos por los mismos, factores con los cuáles TGF- β juega un papel importante en la regulación de la infección (12), ya su presencia ha sido asociada con la exacerbación de la enfermedad, que en última instancia es en gran parte mediada por la disminución en la capacidad lítica de los macrófagos (13). Además de todos estos eventos pro-infección asociados con TGF- β , existe evidencia clara del requerimiento de la activación de señales vía esta citocina para que los tripomastigotes puedan invadir células del hospedero mamífero (32).

El caso de la interleucina IL-10 es similar al de TGF- β debido a que existen diversos trabajos en donde es relacionada con una disminución en la protección a la infección. Ejemplo de esto lo tenemos en el hecho que ratones susceptibles a la infección con *T. cruzi*, producen más cantidad de IL-10 biológicamente activa durante la fase aguda de la enfermedad en comparación con ratones resistentes, los cuáles producen poca o nula cantidad de IL-10 (21). Además, IL-10 tiene la capacidad de inhibir algunas de las funciones de macrófagos, incluyendo activación por IFN- γ (13) e inhibición en la síntesis de óxido nítrico (NO). De esta manera, la inducción de TGF- β e IL-10 promueven la sobrevivencia del parásito, resultando en el aumento de la carga parasitaria y desarrollo de la patología (33).

Aunque la producción endógena de IL-4 no es un importante regulador de la producción de IFN- γ o un determinante de susceptibilidad en la fase aguda de la infección con *T. cruzi* como lo es IL-10, cuando ésta sinergiza con IL-10 se

convierte en un poderoso modulador de la secreción de IFN- γ y de la activación de Th1 durante la infección (8). Este hecho es consistente con la disminución en la producción de IFN- γ por células de ratones susceptibles en presencia de niveles bajos de IL-10. Por otro lado, la secreción de IL-4 esta relacionada inversamente con la producción de IL-2, lo que sugiere una acción antagonica en este contexto. De tal forma que, ya sea asociada con IL-10 o de manera individual, el hecho es que; en cepas susceptibles de ratones, el nivel de IL-4 es mayor respecto a de las cepas resistentes (27).

Existe otro punto de vista con respecto a las citocinas involucradas en susceptibilidad. La citocina IL-10, por ejemplo, que originalmente fue denominada factor inhibidor de la secreción de citocinas y que antagoniza con citocinas activadoras de macrófagos pudiendo inhibir la síntesis de TNF- α , IL-12 por macrófagos y de IL-2 e IFN- γ por linfocitos (34), tiene un papel complejo y en ocasiones contradictorio, ya que así como puede permitir la proliferación del parásito, también la falta total de IL-10 se asocia con patología debida a una respuesta Th1 exagerada, como es el caso de enfermedades inflamatorias intestinales o alta susceptibilidad a choque séptico debido a bacterias y reacciones cutáneas defectuosas, es decir; para la primera fase de la infección con este hemoflagelado, existe un requerimiento crítico de IL-10 para prevenir el desarrollo de una respuesta inmunológica patológica asociada con linfocitos T CD4+ y sobreproducción de IL-12. Ambas citocinas, tanto IL-10 como TGF- β , asociadas con la exacerbación de la infección, han mostrado ser requeridos para la prevención del daño a tejido causado por la excesiva activación de células T, activación asociada con la sobreproducción de IFN- γ e IL-12 (35).

Según las observaciones realizadas por Dutra et al (28), el papel de la interleucina IL-10 en humanos es muy semejante a los modelos murinos propuestos, por lo cuál se piensa que en un futuro se podría establecer alguna terapia basada en la acción moduladora de esta citocina.

Recapitulando, la participación de las citocinas es determinante en el curso de la infección con *T. cruzi* en ratón. Primero, la resistencia está asociada con producción temprana de citocinas tipo Th1 como IL-12 e IFN- γ , siendo el retardo de la producción de estas citocinas el hecho determinante en la falta de control de la fase aguda de la enfermedad en ratón y el cese de producción temprana de IL-2 el factor que refleja supresión general de linfocitos T CD4+ tipo 1, lo que conlleva a un aumento de citocinas Th2 como IL-10, IL-4 y TGF- β (11), que a su vez, están relacionadas estrechamente con susceptibilidad a la infección, pero también son reconocidas como importantes moduladores de una respuesta exagerada de citocinas tipo Th1.

Así como en ratones, en el humano con enfermedad chagásica aguda y crónica, no existe un patrón de citocinas polarizado, sino que hay una mezcla de ambos tipos de respuesta (Th1 Y Th2), lo que hace suponer que en esta enfermedad, así como se requiere de controlar al patógeno (multiplicación intracelular), también se requiere de un control de la respuesta inmunológica del hospedero, evitando así la inmunopatología.

Inmunosupresión en enfermedad de Chagas.

Las respuestas inmunitarias contra las estructuras antigénicas complejas de los parásitos, tienen diversas manifestaciones y no siempre llevan a una completa inmunidad protectora. Al igual que en otras enfermedades infecciosas, la respuesta inmunitaria contra los parásitos puede producir un daño más grave que el microorganismo por sí mismo (36).

Aspecto sobresaliente de algunos parásitos, es la variedad de mecanismos por los cuáles el parásito evade la respuesta inmunitaria del hospedero; puede "escondarse" dentro de las propias células del organismo, disfrazarse de "propio" con los antígenos del hospedero o producir oleadas sucesivas de progonie con diferentes antígenos de superficie (36).

Trypanosoma cruzi, es capaz de evadir parte de la respuesta inmune en su contra y así reproducirse en el organismo. Por ejemplo, se ha visto que en los macrófagos, el parásito puede escapar del fagolisosoma, lo que les permite multiplicarse e infectar a la célula, acción que se cree se logra gracias a sustancias que secretan los tripomastigotes y que inhiben la función lisosomal, evitando así su eliminación (37).

La inmunosupresión no específica debida a varios estímulos, es característica de algunas parasitosis, debido a que la capacidad de los parásitos para adaptarse al ambiente del hospedero, será la esencia de un parasitismo exitoso, dificultando así mucho más el desarrollo de procedimientos de inmunización contra estos agentes (36).

La infección aguda con *Trypanosoma cruzi* se caracteriza por múltiples manifestaciones de inmunosupresión en las respuestas tanto celular como humoral (38-39). Estas deficiencias funcionales, están implicadas con eventos clave en la patogénesis de *T. cruzi* tales como la persistencia del parásito (40) y los disturbios inmunoregulatorios que promueven el ataque inmunológico al

corazón, músculo esquelético y sistema nervioso del hospedero (41) Así, las células B aisladas en la fase aguda de la enfermedad muestran un marcado deterioro en su respuesta a activadores policlonales (42), mientras que observaciones hechas en pacientes y animales de laboratorio muestran también capacidad de proliferación disminuida en linfocitos T, eventos que se atribuye a la capacidad disminuida de dichos linfocitos para producir IL-2 después de su activación, ya que la administración de IL-2 restablece la respuesta inmunológica en ratones chagásicos. Por otro lado, se ha observado que células T humanas activadas, al ser cocultivadas con el protozoario, presentan una disminución de receptores para transferrina, CD3, CD4, y CD8 (28) y trabajos semejantes con ratones reflejan defectos en el receptor CD3 de la célula (43).

Sin embargo, también existe evidencia de que la inmunosupresión en esta infección es mantenida por macrófagos con actividad supresora, los cuáles producen TGF- β o IL-10 de manera preferencial y/o presentan una disminución de moléculas clase II (44).

Continuando con la capacidad inmunosupresora de *T. cruzi*, algunos autores reportan que su presencia puede inhibir la producción de citocinas importantes en la respuesta de linfocitos activados, entre ellas IL-4, IL-5 e IFN- γ (45). Así mismo, algunos antígenos de superficie del parásito inducen activamente la producción de IL-10 durante la fase temprana de la infección, citocina que generalmente inhibe la respuesta de células T a través de la reducción en la actividad de los macrófagos (34), creándose así un microambiente adecuado para continuar infectando al hospedero.

Así, la inmunosupresión es uno de los eventos más importantes a tomar en cuenta en la infección con *T. cruzi*, debido a la serie de alternativas que tiene este parásito para provocar un estado poco favorable del sistema inmune del hospedero.

Apoptosis en la enfermedad de Chagas

Recientemente, la apoptosis o muerte celular programada ha mostrado ser un factor determinante en las interacciones hospedero-patógeno ya que los microorganismos son capaces de manipular la apoptosis de las células del hospedero en diferentes formas, tanto para incrementar su duración dentro de las células infectadas como para esparcir la infección (46)

Aunque la activación de células T maduras de órganos linfoides secundarios usualmente promueven la producción de citocinas y la proliferación, algunos reportes han descrito la reinducción de muerte celular programada en estas células (47), más allá de la necesidad de esta para eliminar la intensa expansión de las mismas una vez que se ha exterminado al patógeno. Una conclusión similar se tiene con respecto a linfocitos B, ya que algunos resultados indican que la apoptosis de estas células podría ser un mecanismo de control de expansión de células B pero al mismo tiempo dicho mecanismo podría estar retrasando la respuesta específica contra el patógeno. (42) Por tanto, la activación de muerte celular programada puede estar implicada en la deficiente respuesta celular (48) y humoral del hospedero contra agentes infecciosos

Un informe preliminar, mostró que existe apoptosis abundante en infiltrados inflamatorios de corazón en un modelo canino de miocarditis chagásica, apoptosis que afectaba tanto a linfocitos como a miocitos infectados y no infectados e incluso al parásito (49), aunque algunos trabajos en humanos sugieren que son solo las células mononucleares infiltradas las que se encuentran en dicho proceso (50).

La apoptosis en los linfocitos puede derivarse de la poderosa activación de los mismos disparada por la infección, activación que requiere de procesos reguladores del mismo hospedero (51), propuesta consistente con la hipótesis que plantea la entrada en apoptosis de células T maduras, después del acoplamiento del receptor de T en células en ciclo celular activo (52)

La relación molecular entre linfocitos cíclicos e inmunosupresión es la muerte celular a través del receptor de membrana Fas (CD95), ya que después de repetidos ciclos celulares, las células CD4+ se regulan a sí mismas a través de apoptosis mediada por Fas (53). La expresión del ligando para Fas se induce después que el receptor para T es ocupado (54). Así, mientras la unión de Fas-FasL promueve la apoptosis de linfocitos, incrementa la replicación del parásito y elimina mucha de la producción de IFN- γ por células T, el bloqueo de FasL, previene la apoptosis de linfocitos y reduce la replicación del parásito (55). Por tanto, el parásito es capaz de tomar ventaja de la apoptosis de células T para replicarse y esparcirse en los tejidos, incluso se ha observado que moléculas aisladas de *T. cruzi*, pueden inducir directamente apoptosis de las células del hospedero, tales como CD4+ y macrófagos aún en presencia de IFN- γ (56), esto último indica otro mecanismo de escape del parásito de la inmunidad mediada por células y de los efectos de IFN- γ . Por otro lado, se ha observado que la fagocitosis de células apoptóticas desactiva a los macrófagos, promoviendo así, el crecimiento del parásito en los mismos y exacerbando la parasitemia (57).

Mientras que la entrada en apoptosis de las células infectadas del hospedero sería ventajosa para el mismo, en el caso de parásitos móviles sin embargo; la liberación de estos promueve el esparcimiento de la infección (58).

Los datos mostrados aquí dan luz de la importancia del estudio de la entrada en apoptosis de las células hospederas, además de indicar que la intervención de esta puede promover importantes modificaciones en las interacciones hospedero-parásito en infecciones crónicas (46).

Hoy en día existen diversas técnicas a través de las cuáles es posible evidenciar si las células se encuentran en estado apoptótico, las cuáles incluyen microscopía electrónica y marcadores de superficie o intracelulares característicos de una célula en apoptosis. La endonucleólisis es considerada como el evento bioquímico clave de la apoptosis que resulta en ruptura del DNA nuclear en oligonucleosomas. Un método sencillo y eficaz para la detección de

apoptosis en células de manera individual basado en este evento clave es la incorporación enzimática de nucleótidos fluorescentes en las cadenas de DNA rotas (TUNEL) (24).

Hipótesis

Como ya se menciona anteriormente, la enfermedad de Chagas es un problema importante de salud pública en Latinoamérica, no siendo la excepción nuestro país. Los individuos que coexisten con el vector, están expuestos a picaduras recurrentes del triatomino y por tanto a infecciones frecuentes. Así, la reinfección es una variable medio-ambiental importante a tomar en cuenta en la respuesta inmune contra un agente infeccioso.

En el caso de la tripanosomosis americana, existe información acerca de los eventos inmunológicos que ocurren en la infección con el parásito, más no existe tal información con respecto a estos eventos en dos o más encuentros del sistema inmune contra *T. cruzi*, en donde la memoria inmunológica debe de conferir mayor resistencia al hospedero.

Siendo el perfil de citocinas generado en una infección uno de los marcadores principales de la respuesta inmune, es por ello que en este trabajo se eligió como la herramienta para conocer el "estado" de dicha respuesta contra *T. cruzi* en la reinfección. Se espera que la producción de citocinas buscadas sea temprana y en mayor proporción a la observada en ratones infectados debido a la memoria inmunológica presente en organismos estimulados previamente con el mismo antígeno.

Así mismo, existen antecedentes de la entrada en apoptosis de células involucradas en la respuesta inmune contra *T. cruzi* especialmente cuando hay una continua estimulación de las mismas, hecho que ocurriría en una reinfección. Por tanto, en los tejidos de animales re infectados es probable que se encuentren células en apoptosis como un posible mecanismo de inmunosupresión que actúe en enfrentamientos repetidos con el parásito.

Tomando en cuenta que el sitio de inoculación es el lugar en donde el organismo comienza a defenderse contra el agente infeccioso y que el parásito tiene un tropismo característico, dos tejidos importantes para buscar las respuestas antes mencionadas es el sitio de inoculación (piel del cojinete plantar) y el ganglio linfático regional (ganglio popíteleo), en donde ocurrirán eventos inmunológicos importantes.

Objetivos Generales

- Determinar cuál es el perfil de citocinas existente en piel y ganglio de ratones expuestos a repetidas reinfecciones con *Trypanosoma cruzi*
- Determinar, caracterizar y semicuantificar la inflamación en piel de ratones expuestos a repetidas reinfecciones con *Trypanosoma cruzi*
- Determinar la presencia de células apoptóticas involucradas en la respuesta inmune en piel y ganglio de ratones expuestos a repetidas reinfecciones con *Trypanosoma cruzi*

Objetivos Particulares

- Determinar la presencia de *Trypanosoma cruzi* en sangre periférica de ratones expuestos a repetidas reinfecciones por observación directa y PCR
- Determinar la presencia o ausencia de IL-2, IL-10, IL-4, IL-12, TGF- β e IFN- γ en piel (sitio de inoculación) y ganglio regional de ratones expuestos a repetidas reinfecciones con *Trypanosoma cruzi*.
- Semicuantificar a través de densitometría las citocinas encontradas en piel (sitio de inoculación) y ganglio regional de ratones expuestos a repetidas reinfecciones con *Trypanosoma cruzi*.

- Cuantificar las células en apoptosis encontradas en piel y ganglio regional de ratones expuestos a repetidas reinfecciones con *Trypanosoma cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Obtención de parásitos.

Triatomíneos adultos infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi* (cepa Ninoa) se alimentaron con sangre de conejo. Posteriormente se colocaron en un cristalizador con el fin de poder tomar con una jeringa la orina que fueran excretando. Se revisó al microscopio la presencia de parásitos en las muestras de orina de triatomíneos infectados y la ausencia de los mismos en triatomíneos no infectados. Posteriormente se cuantificó con una cámara de Neubauer la cantidad de parásitos por ml con la que se obtuvo la cantidad de muestra que se debía inocular. Las diluciones necesarias de la orina se hicieron en PBS (Amortiguador de Fosfatos Salino, pH 7.4) estéril.

Inoculación de animales

Treinta ratones hembra (*Mus musculus*) de la cepa Balb/c fueron inoculados vía intradérmica en el cojinete plantar de ambas extremidades posteriores, con 20µl (dilución de orina y PBS) que contenían 1,000 parásitos.

Quince ratones fueron inoculados con una dilución igual de orina de triatómino no infectado con el parásito para ser utilizados como testigos.

Los ratones se inocularon por segunda vez (primera reinfección) mes y medio después de la primera inoculación, repitiendo este proceso una vez más a fin de obtener ratones infectados por tercera vez o con dos reinfecciones. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los animales testigos.

Disecciones

Se tomaron cuatro ratones antes de ser re infectados por segunda vez (tiempo 0) y se sacrificaron por dislocación cervical. Se disectó la piel de los cojinetes plantares, así como el ganglio popíteo de las dos extremidades inferiores. Estas mismas disecciones se realizaron en los animales re infectados por segunda vez a cinco tiempos diferentes, que fueron 1, 3, 7, 15 y 30 días después de la última re infección a fin de evaluar lo sucedido en la fase crítica de la infección.

Así mismo, 2 ratones tratados con orina sana se utilizaron en cada tiempo para obtener los mismo tejidos.

Detección de *T. cruzi* en sangre periférica (observación directa)

Se tomaron 4 ratones re infectados al azar del lote infectado por segunda vez con el fin de extraer sangre periférica cada 4 días de cada uno de ellos, a partir del día 9 y culminando el día 41 post-re infección. Esto se realizó haciendo un pequeño corte de la parte terminal de la cola. Una gota de sangre se colocaba en un portaobjetos y se revisaba inmediatamente al microscopio para determinar la presencia del parásito en cada uno de los animales. A su vez, 100 μ l de esta sangre se colocaban en un tubo con buffer de lisis para llevar a cabo extracción de DNA de cada una de estas muestras y posteriormente por medio de PCR determinar la presencia del parásito.

Extracción de DNA para PCR

Parte del material obtenido en las disecciones se colocaba en buffer de lisis (250 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 1 mM, NP-40, SDS 1%) estéril en donde se maceraba y posteriormente se le agregaba proteinasa K (0.1 mg/ml), con la cuál se incubaba durante 24 horas a 42° C con el fin de digerir el tejido lo más posible. Después de la incubación se agregaba a cada muestra fenol (vol/vol) para la extracción de DNA, se centrifugaban a 1000 g^s durante 5 minutos. La fase acuosa se pasaba a un tubo nuevo y se agregaba nuevamente fenol (vol/vol) centrifugando de la misma manera que en el paso anterior. Nuevamente se separaba la fase acuosa y esta vez se agregaban dos volúmenes de etanol absoluto frío y una décima parte de acetato de sodio (3 M, pH 5.2). Se incubaron a -20° C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaban a 13,000 g^s durante 10 m. El sobrenadante se retiraba y el botón se lavaba dos veces con etanol al 70% centrifugándolo a 11,000 g^s durante 5 min en cada ocasión. El exceso de etanol se retiraba y se esperaba hasta que este se evaporara por completo. El botón obtenido se reconstituía en agua estéril y de cada una de las muestras se obtenía la densidad óptica a dos longitudes de onda (260 y 280 nm) en un espectrofotómetro Beckman. Para calcular la concentración de DNA que existía en cada una de las muestras se tomaba la lectura dada en la longitud de onda de 260 nm (longitud adecuada para ácidos nucleicos) y se usaba la siguiente relación:

$$50 \mu\text{g de DNA} = 1 \text{ U.D.O}$$

La concentración de DNA se comparó en cada caso con la concentración de proteínas (lectura dada a 280 nm) en las muestras. Así, para que la muestra de

DNA se utilizara para alguno de los ensayos, tenía que existir una relación DNA/proteína ≥ 1.5 contando así con DNA relativamente puro (59)

Extracción de RNA para cDNA

Parte del material obtenido en las disecciones se colocaba en 1 ml de trizol por cada 50 mg de tejido, a este se agregaban 200 μ l de cloroformo por ml de trizol, se agitaba fuertemente la muestra y se centrifugaba a 13,000 g 's durante 15 minutos a 4° C. La fase acuosa obtenida se separaba en un tubo nuevo y se agregaba esta vez 500 μ l de isopropanol por ml de trizol utilizado. Esta mezcla se incubaba durante una hora a -20° C. Pasado el tiempo de la incubación, se centrifugaba a 13,000 g 's durante 10 min a 4° C. El botón obtenido se lavaba 2 veces con etanol al 70%. Una vez que el etanol se evaporaba por completo, este se resuspendía en agua con inhibidores de RNasa (DEPC 50-100u/ml) y de cada una de las muestras se obtenía la densidad óptica a dos longitudes de onda (260 y 280 nm) en un espectrofotómetro Beckman. Para calcular la concentración de RNA que existía en cada una de las muestras se tomaba la lectura dada en la longitud de onda de 260 nm (longitud adecuada para ácidos nucleicos) y se usaba la siguiente relación:

$$40 \mu\text{g de RNA} = 1 \text{ U.D.O}$$

La concentración de RNA se comparo en cada caso con la concentración de proteínas (lectura dada a 280 nm) en las muestras. Así, para que la muestra de RNA se utilizara para alguno de los ensayos, tenía que existir una relación RNA/proteína ≥ 1.5 contando así con RNA relativamente puro (59).

Síntesis de cDNA para RT-PCR

Del RNA extraído de cada muestra de tejido se tomaron 2 µg, a su vez a estos se les agregó 1 µl de Oligo-dt, esta mezcla se incubaba durante 15 m a 70°C para después enfriar en hielo. Se agregaban 4 µl de buffer (20Mm Tris-HCl, 100Mm NaCl, pH 7.5) 5X, 1µl de nucleótidos (10mM), 2µl de DTT y se incubaba por 2 min a 37°C. Se agregaba 1µl de la enzima transcriptasa reversa, con la cuál se incubaba durante 1 hora a 37° C. Finalmente la reacción se detenía sometiendo las muestras 15 minutos a 70° C (59).

Detección de DNA de *Trypanosoma cruzi* por PCR

Se utilizó la técnica de PCR para detectar la presencia de *T. cruzi* en sangre periférica, piel y ganglio. Para este ensayo se utilizó el DNA extraído de cada una de las muestras a los distintos tiempos. Los oligonucleótidos o "primers" utilizados (KNS1 Y KNS2) están diseñados para amplificar específicamente una porción del cinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* de 300 pb. Sus secuencias son:

KNS1 5'GGGGTTCGATTGGGGTTGGTGTA 3'

KNS2 5'AAAGTTTGAACGCCCTCCCAA 3

En un tubo se colocó la mezcla de reacción previamente estandarizada.

Amortiguador de reacción	(10X)	5 µl
Cloruro de Magnesio	(20X)	2.5 µl
dNTP ^s	(10mM)	1 µl
Primer 1	(0.25 µM)	1 µl
Primer 2	(0.25 µM)	1 µl
Muestra de DNA		1 µl
Taq polimerasa	(2.5 U)	1 µl
Agua estéril		37.5 µl
	TOTAL	50 µl

Las mezclas de reacción se sometieron a un programa previamente estandarizado en un termociclador (Biometra T Gradient), donde los tiempos y temperaturas para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa fueron los siguientes:

PROCESO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización	94° C	5'	1
Desnaturalización	94° C	1'	
Alineación	55° C	1'	30
Extensión	72° C	1'	
Desnaturalización	94° C	1'	
Alineación	55° C	1'	1
Extensión	72° C	5'	
Incubación	4° C	∞	

Para cada muestra se incluyeron un control positivo (DNA de *T. cruzi* aislado de un cultivo del parásito) y uno negativo (sin DNA) (60).

Detección de mRNA de citocinas por RT-PCR

Para evidenciar la presencia de mRNA de las citocinas IL-12, IL-10, IL-2, IL-4, IFN- γ y TGF- β en las distintas muestras de tejidos, se realizó una prueba de reacción en cadena de la polimerasa con el cDNA de cada una de estas muestras (RT-PCR) y con "primers" específicos para cada una de las citocinas.

Las secuencias de los mismos se muestran a continuación:

IL-12	primer 1	5' CGT GCT CAT GGC TGG TGG AAA G 3'
	primer 2	5' CTT CAT CTG CAA GTT CTT GGG 3'
IL-10	primer 1	5' ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T 3'
	primer 2	5' ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG GTT T 3'
IL-2	primer 1	5' GAC AGA AGG CTA TCC ATC TCC TCA GAA AGT CC 3'
	primer 2	5' TTC AAG CTC CAC TTC AAG CTC TAC AGC GGA AG 3'
IL-4	primer 1	5' CCA GCT AGT TGT CAT CCT GCT CTT CTT TCT CG 3'
	primer 2	5' CAG TGA TGT GGA CTT GGA CTC ATT CAT GGT GC 3'
IFN- γ	primer 1	5' TGG ACC TGT GGG TTG TTG ACC TCA AAC TTG GC 3'
	primer 2	5' TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG GC 3'
TGF- β	primer 1	5' TGG ACC GCA ACA ACG CCA TCT ATG AGA AAA CC 3'
	primer 2	5' TGG AGC TGA AGC AAT AGT TGG TAT CCA GGG CT 3'
β -actina	primer 1	5' TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C 3'
	primer 2	5' TAA AAC CGC AGC TCA GTA ACA GTC CG 3'

En un tubo se colocó la mezcla de reacción previamente estandarizada.

Amortiguador de reacción	(10X)	5 µl
Cloruro de Magnesio	(20X)	2.5 µl
dNTP's 1.25 mM	(10mM)	1 µl
Primer 1	(0.25 µM)	1 µl
Primer 2	(0.25 µM)	1 µl
Muestra de DNA		1 µl
Taq polimerasa	(2.5 U)	1 µl
Agua estéril		37.5 µl
	TOTAL	50 µl

Las mezclas de reacción se sometieron a un programa previamente estandarizado en un termociclador Biometra T Gradient. Las reacciones se iniciaron a 94° C durante 5 minutos y los tiempos y temperaturas para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa fueron los siguientes:

PROCESO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización	94° C	5'	1
Desnaturalización	94° C	1'	
Alineación	60° C	45 s	30
Extensión	72° C	45 s	
Desnaturalización	94° C	1'	
Alineación	60° C	45 s	1
Extensión	72° C	5'	
Incubación	4° C	∞	

Para cada muestra se incluyeron dos controles positivo, uno con "primers" para β -actina (proteína constitutiva de las células) y otro con una reacción amplificada con anterioridad de β -actina y un control negativo (sin cDNA) (4).

El número de bases esperado para cada citocina fue:

IFN- γ	365 pb
IL-2	413 pb
IL-4	367 pb
IL-10	455 pb
IL-12	320 pb
TGF- β	573 pb
B-actina	340 pb

Electroforesis

Cada uno de los productos de las PCR^s se corrió en una electroforesis con gel de agarosa al 1.5% para evidenciar los productos amplificados. Se utilizaron 10 μ l de cada muestra más 2 μ l de buffer de carga (GIBCO), esta mezcla se depositaba en los pozos del gel y se agregaba amortiguador TBE (Tris-borato-EDTA)1X a la cámara para realizar la corrida. En cada corrida se colocó un marcador de peso molecular (GIBCO) para comprobar que los amplificados correspondieran al peso esperado en pares de bases de la porción del minicírculo o de las citocinas de interés. Los geles se corrieron a 55 V durante 1.5 h aproximadamente. Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (10 mg/ml) durante 3 minutos para observarlos posteriormente en un transiluminador de luz UV (59).

Semicuantificación de citocinas

Los geles de cada una de las corridas fueron fotografiados y con un densitómetro (Bio-Rad 65-670) se "escanearon" dichas fotos para posteriormente poder determinar las áreas de cada una de las bandas amplificadas, tanto de citocinas como de β -actina con el programa Molecular Analyst versión 1.1. Se otorgo de manera arbitraria el valor de 1 a las áreas encontradas para β -actina en cada corrida y con respecto a este se comparo cada una de las áreas obtenidas para las bandas de citocinas en la corrida correspondiente.

Determinación de proceso inflamatorio.

Parte del material obtenido en las disecciones fue incluido en parafina, de cada uno de ellos se realizaron 25 cortes a lo largo de todo el tejido y se tiñeron con hematoxilina-eosina, tinción con la cuál fue posible evidenciar las células involucradas en el proceso de inflamación. Estas células fueron cuantificadas por campos en un aumento de 400X. Para cada tiempo se contaron al menos 10 campos y se calculó un promedio de número de células por campo. Se caracterizó el infiltrado de acuerdo a su composición principal en mononucleares (6 μ m, muy redondos y casi completamente teñidos), células plasmáticas (15 μ m y con una gran cantidad de citoplasma) y macrófagos (entre 30 y 50 μ m, con gránulos teñidos en citoplasma además de prolongaciones del citoplasma) (26).

Determinación de presencia de apoptosis

Parte del material obtenido (piel y ganglio) de las disecciones fue congelado en nitrógeno líquido, para posteriormente realizar cortes en frío. Con estos corte se llevó a cabo la prueba de TUNEL (*in situ* cell death detection AP ROCHE) para evidenciar la presencia de células en apoptosis. Este método consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con fluoresceína a través de la enzima deoxinucleotidil-transferasa en las zonas donde el DNA se ha roto en fragmentos o nucleosomas. Los tejidos sometidos al ensayo de apoptosis, fueron permeabilizados con Triton X-100, después se le agregó la enzima y la mezcla de nucleótidos marcados con fluoresceína. Se utilizó el conjugado anti-fluoresceína-fosfatasa y el ensayo se reveló con la adición del sustrato para fosfatasa alcalina NBT/BCIP. El porcentaje de las células en apoptosis se leyó en el microscopio a un aumento de 400X. En todos los ensayos se incluyeron controles positivos y negativos para apoptosis. El control positivo consistió en cada ocasión de laminillas con leucocitos adheridos tratados durante 10 minutos con DNasa a una concentración de 1 mg /ml. Los controles negativos fueron dos en cada ocasión, uno, utilizando laminillas con leucocitos adheridos con las cuáles se llevaba a cabo el mismo procedimiento que para los problemas excepto la incorporación de la enzima y otro control en donde se utilizaba una laminilla con el tejido problema y en las cuáles solo se incorporaba el revelador (NBT/BCIP) a fin de evidenciar la presencia de fosfatasa endógena presente en el mismo tejido.

El porcentaje de células apoptóticas se obtuvo contando el número de células normales y en apoptosis en al menos 10 campos a un aumento de 400x. Las células en los bordes de los tejidos no fueron contadas.

Diagrama de Flujo de Procedimientos Experimentales

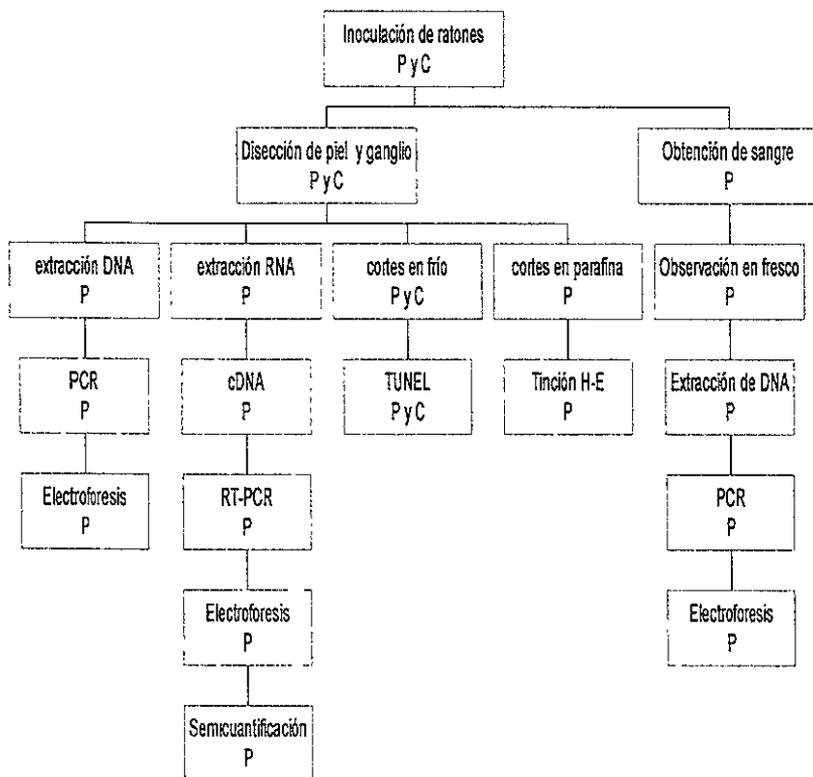


Figura 1. Diagrama de flujo de los procedimientos experimentales utilizados.

P ensayos realizados para animales problema

C ensayos realizados para animales control

RESULTADOS

Detección de *T. cruzi* en sangre periférica

Se utilizaron dos métodos para evidenciar la presencia del parásito en sangre periférica, observación directa de la muestra de sangre y PCR. En una curva típica de parasitemia con *T. cruzi*, el parásito comienza a observarse directamente alrededor del día 15, con un pico entre el día 20 y 25, el cuál comienza a decaer hasta que alrededor del día 40 al 50 el parásito ya no es detectable, es por ello que se hizo la búsqueda del parásito a partir del día 9 y finalizando el día 41 post-reinfección, dentro de este intervalo las muestras se tomaron cada 4 días.

En este trabajo, no se observó a ningún tiempo al parásito en las muestras en fresco de ninguno de los cuatro ratones, siendo imposible establecer la cantidad de parásitos por ml y por tanto realizar una curva de parasitemia.

A través de PCR, el cuál claramente es un método mucho más sensible que la observación directa ya que requiere de solo unas cuantas moléculas y no del organismo completo, se detectó la presencia de DNA del parásito en todos los animales problema, exceptuando en las muestras obtenidas el día 25, donde probablemente ocurrió una degradación del DNA.

En el cuadro 1 se muestra la comparación entre los resultados obtenidos por observación directa y los de PCR de la sangre periférica de los mismos animales problema tomada a los mismos tiempos, en donde el signo positivo (+) representa que el parásito fue detectado y el negativo (-) la situación opuesta.

Cuadro 1. Detección de DNA de *T. cruzi* a distintos tiempos por observación en fresco y PCR en **sangre periférica** de animales re infectados.

	Observación en fresco	PCR
Día 9	-	+
13	-	+
17	-	+
21	-	+
25	-	-
29	-	+
33	-	+
37	-	+
41	-	+

Se reporta el resultado de 4 ratones

Los resultados corresponden a días después de la segunda re infección

La electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR de sangre periférica, muestra que cada uno de los ratones sujetos a múltiples re infecciones contienen en sangre DNA del parásito, ya que el producto amplificado corresponde al peso esperado (300pb), hecho que se comprobó con el control positivo para *T. cruzi*, el cuál es DNA del parásito extraído directamente de un cultivo. La ausencia de contaminación se comprobó igualmente con el control negativo en donde la muestra no contiene DNA.

La figura 2 es una imagen representativa de las electroforesis realizadas para evidenciar cada tiempo, en donde del carril 2 al 5 podemos observar las muestras problema de los distintos ratones y en el carril 7 el control positivo, ambos se encuentran ubicados en la línea de 300 pb del marcador de peso molecular, mientras que el control negativo (B2), no presenta banda, es decir, el ensayo no estuvo sujeto a contaminación.

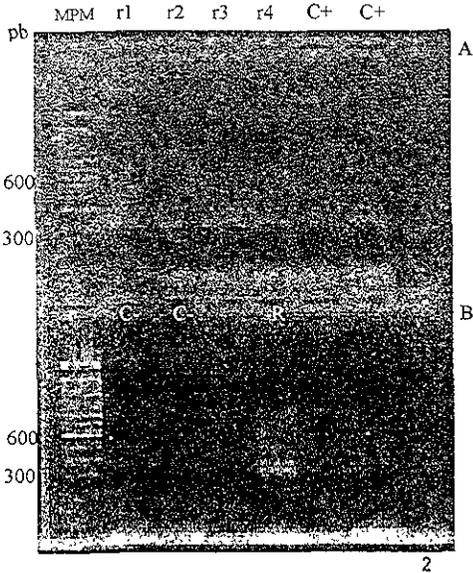


Figura 2. Imagen de los productos amplificados de sangre periférica extraída 15 días post-reinfección con oligonucleótidos para *T. cruzi* (gel de agarosa)

pb pares de bases

MPM marcador de peso molecular

* r corresponde al número de ratón

C+ control positivo

C- control negativo

R reamplificado

Determinación de *T. cruzi* en piel y ganglio

En los dos tejidos de interés principal (sitio de inoculación y ganglio regional), se buscó la presencia del parásito a través de PCR. Los resultados indican que este no se encuentra, o al menos no en cantidad detectable en el sitio de inoculación a ninguno de los días post-reinfección elegidos, días que a su vez son representativos de la fase aguda de la infección. Mientras, en ganglio regional al menos hasta el día 15 post-reinfección, si está presente *T. cruzi*.

En el cuadro 2 está representada la presencia (+) o ausencia (-) de DNA del parásito en los distintos tiempos.

Cuadro 2. Detección de DNA de *T. cruzi* a distintos tiempos por PCR en piel y ganglio de animales re infectados

	Piel	Ganglio
Día 0*	-	+
1	-	+
3	-	+
7	-	+
15	-	+
30	-	-

*Muestra tomada un día antes de la 2ª. reinfección

Las electroforesis correspondientes a estos ensayos, se llevaron a cabo bajo las mismas circunstancias y parámetros de aquéllas para la detección del parásito en sangre. Se encontró de igual manera que las bandas de los productos amplificados correspondían al peso esperado de 300 pb y los controles mostraron la adecuada realización del ensayo (imágenes no mostradas)

Determinación de RNAm citocinas en piel y ganglio

Por RT-PCR se determinó la presencia o ausencia en ganglio y piel de mRNA de las distintas citocinas buscadas. En piel se detectó la presencia de IFN- γ a los 7 y 15 días post-reinfección. Ninguna otra señal de las demás citocinas apareció a ningún tiempo (cuadro 3).

Cuadro 3. Perfil de citocinas por RT-PCR en piel de animales re infectados con *T.cruzi*

	IL-4	IL-10	TGF- β	IL-2	IL-12	IFN- γ
Día 0*	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	+
30	-	-	-	-	-	-

Animales inocuados con 1,000 tripomastigotes metacíclicos vía intradérmica.

* muestra tomada un día antes de la 2ª. reinfección

En el caso del ganglio popítleo, mRNA de IL-4 fue detectado al primer y tercer día post-reinfección. La señal desapareció al siguiente tiempo evaluado (día siete). Mientras que la presencia de IL-12 fue confirmada a los días 1, 7 y 15 post-reinfección (cuadro 4).

Cuadro 4. Perfil de citocinas por RT-PCR en ganglio de animales re infectados con *T. cruzi*

	IL-4	IL-10	TGF- β	IL-2	IL-12	IFN- γ
Día 0*	-	-	-	-	-	-
1	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	+	-
15	-	-	-	-	+	-
30	-	-	-	-	-	-

Animales inoculados con 1,000 tripomastigotes metacíclicos vía intradérmica.

* muestra tomada un día antes de la 2ª. reinfección

La electroforesis en gel de agarosa para evidenciar los productos amplificados por RT-PCR de las distintas citocinas de interés, mostró bandas perfectamente distinguibles unas de otras, con lo cuál se pudo determinar el peso específico de cada una de ellas, evitando así la interpretación errónea de los resultados. Ejemplo de esto, lo tenemos en la figura 3, en donde en el carril A6 que corresponde a la muestra con oligonucleótidos para IL-2, la cuál tiene un peso esperado de 413 pb y en este caso la banda aparece en un peso molecular de

340 pb, convirtiéndose por tanto en un amplificado inespecífico. El control positivo del ensayo (β -actina) presenta dos bandas, una de las cuáles sin lugar a dudas corresponde al peso esperado (340 pb) y la otra nuevamente un amplificado inespecífico. El control negativo mostró ausencia de contaminación en cada uno de los ensayos (B4). La única banda de las muestras problema que aparece de acuerdo a su peso fué la correspondiente a la muestra con oligonucleótidos para IFN- γ , con lo que se confirma la presencia de mRNA de esta citocinas en la piel extraída a los 7 días post-reinfección, tal como lo muestra el cuadro 3.

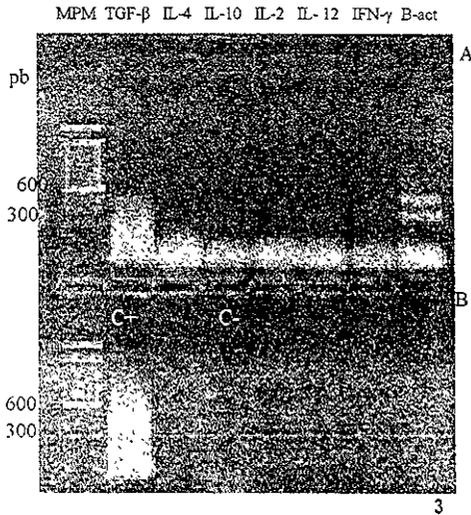


Figura 3. Imagen de los productos amplificados de piel extraída 7 días post-reinfección con oligonucleótidos para citocinas (gel de agarosa)

pb pares de bases

MPM marcador de peso molecular

C+ control positivo

C- control negativo

Para el día 15 post-reinfección la señal para IFN- γ apareció nuevamente en la muestra de piel (cuadro 3) en el carril y peso esperados. El control de β -actina nuevamente fue positivo, mientras que el control negativo se mantuvo sin contaminación a lo largo de cada una de las electroforesis (imagen no mostrada).

Con respecto al corrimiento de las muestras de los productos amplificados en ganglio, se observó que a las 24 horas post-reinfección, el RNAm mensajero de IL-4 y de IL-12 se encuentra presente en dicho tejido (cuadro 4 y fig. 4). Nuevamente aparecieron bandas que no corresponden al peso esperado, tomándose como amplificados inespecíficos, mientras que los controles positivo (B2) y negativo (B), muestran que el ensayo se llevó en las condiciones correctas.

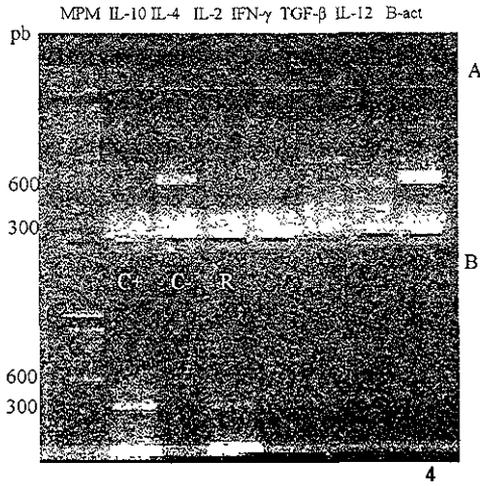


Figura 4. Imagen de los productos amplificados de ganglio extraído 1 día post-reinfección con oligonucleótidos para citocinas (gel de agarosa)

pb pares de bases

MPM marcador de peso molecular

C+ control positivo

C- control negativo

R reamplificado

Para el día 3 se detectó una vez más la presencia de IL-4 en ganglio, además de IL-12 al día 7 y 15 (cuadro 4), las condiciones y criterios fueron los mismos que los utilizados en cada uno de los corrimientos anteriores (imágenes no mostradas)

Semicuantificación de citocinas

Una vez que se determinó la presencia o ausencia de las diferentes citocinas en el sitio de inoculación y ganglio, se utilizaron las bandas correspondientes a cada amplificado a fin de obtener un estimado cuantitativo de cada una de ellas con respecto a la proteína constitutiva β -actina. Las áreas de cada banda fueron comparadas con el área de β -actina en el gel correspondiente, área que arbitrariamente recibió el valor de 1. Ya que en piel solamente se encontró IFN- γ en dos de los seis tiempos, solo estas dos bandas pudieron ser sujetas a semicuantificación, determinando un valor relativo para cada una de ellas, que en ambos casos está por arriba de la mitad del establecido para β -actina (cuadro 5).

Cuadro 5. Valor de las citocinas amplificadas con respecto a β -actina en piel de animales re infectados con *T. cruzi*

	Citocina	Valor
Día 7	IFN- γ	0.63
15	IFN- γ	0.85

El valor asignado al área de β -actina es 1

En el caso de ganglio fueron 5 los productos amplificadas a distintos tiempos y al igual que en piel, de cada una de estas bandas se obtuvo un valor de acuerdo a su área y con respecto al área de β -actina. Nuevamente los valores obtenidos para las muestras problema están por arriba de la mitad del valor de β -actina e incluso para el caso de la señal de IL-4 al tercer día post-reinfección los valores fueron equivalentes (cuadro 6)

Cuadro 6. Valor de las citocinas amplificadas con respecto a β -actina en ganglio de animales re infectados con *T. cruzi*

	Citocina	Valor
Día 1	IL-4	0.68
1	IL-12	0.55
3	IL-4	1.01
7	IL-12	0.95
15	IL-12	0.72

El valor asignado al área de β -actina es 1

Determinación, caracterización y semicuantificación del proceso inflamatorio.

En los cortes de piel y ganglio teñidos con hematoxilina-eosina fue posible observar de manera individual a las células infiltradas, distinguiéndolas de acuerdo a su morfología en macrófagos, mononucleares y células plasmáticas (células involucradas en la inflamación de tipo crónica). Se observó un incremento considerable en la cantidad de infiltrado durante la primera semana post-reinfección, el cuál disminuyo hacia los últimos tiempos analizados (cuadro 7).

Cuadro 7. Número y tipo de células infiltradas en piel de animales re infectados con *T. cruzi*

	Mononucleares	Macrófagos	Plasmáticas	Total
Día 0*	7	3	0	10
1	9	3	3	15
3	13	3	19	35
7	11	5	8	24
15	4	4	8	16
30	3	0	0	3

Se reporta el promedio de células por campo

En la figura 5 podemos observar el infiltrado existente en piel a los 7 días post-reinfección, el cuál es representativo de los demás tiempos, debido a que en todos los tiempos observados, la composición de dicho infiltrado es similar, modificándose solo un poco en cuanto a cantidad.

Como ya se mencionó, el infiltrado en piel consistió básicamente de macrófagos, mononucleares y células plasmáticas, las cuáles fueron reconocidas por su morfología. En la figura 6 podemos observar mononucleares ($6\ \mu\text{m}$, muy redondos y casi completamente teñidos), células plasmáticas ($15\ \mu\text{m}$ y con una gran cantidad de citoplasma) y macrófagos (entre 30 y $50\ \mu\text{m}$, con gránulos teñidos en citoplasma además de prolongaciones del citoplasma).



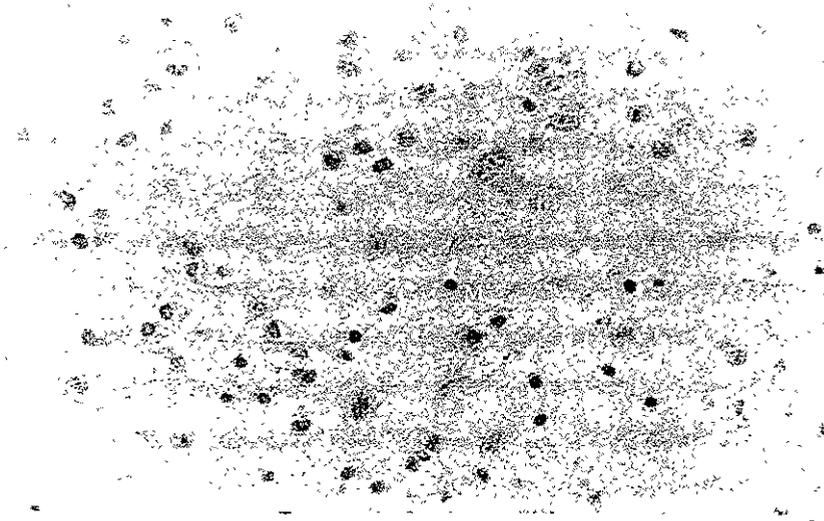
5

Fig 5. Piel de ratón extraída a los 7 días post-reinfección (H-E) 40X

E epidemis

D dermis

Cl célula infiltrada



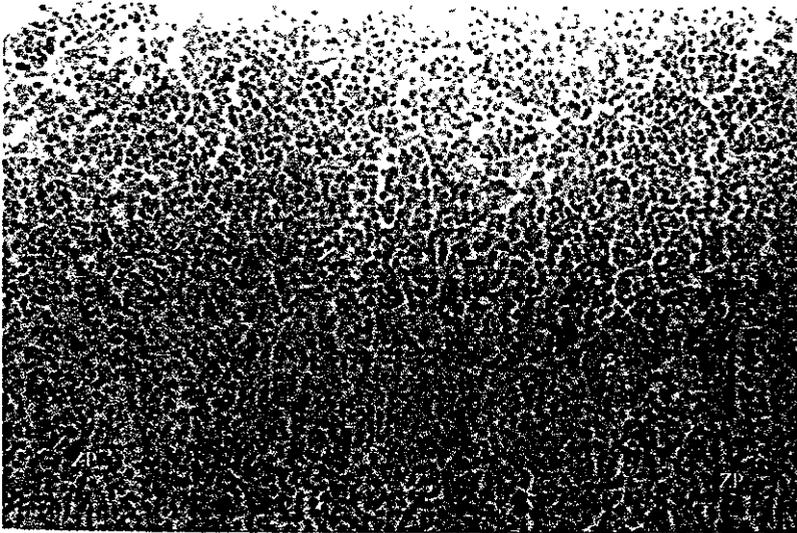
6

Fig 6. Piel de ratón extraída a los 15 días post-reinfección (H-E) 40X

M célula mononuclear

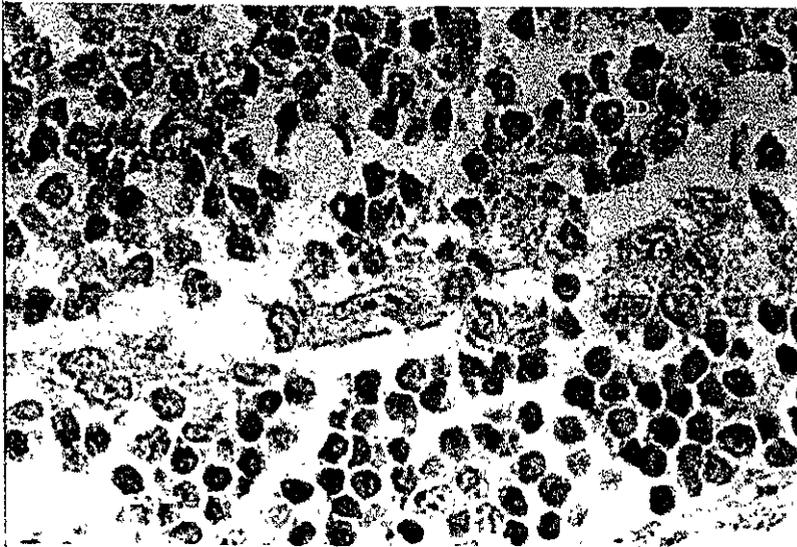
P célula plasmática

En ganglio solo es posible observar algunas zonas en las que los linfocitos están más intensamente teñidos, lo cual es una señal de la activación y proliferación de los mismos, eventos ocurridos en este caso por el estímulo antigénico del parásito (figura 7y 8).



7

Figura 7. Ganglio de ratón extraído a los 7 días post-reinfección (H-E) 25X
ZP zonas con linfocitos en proliferación



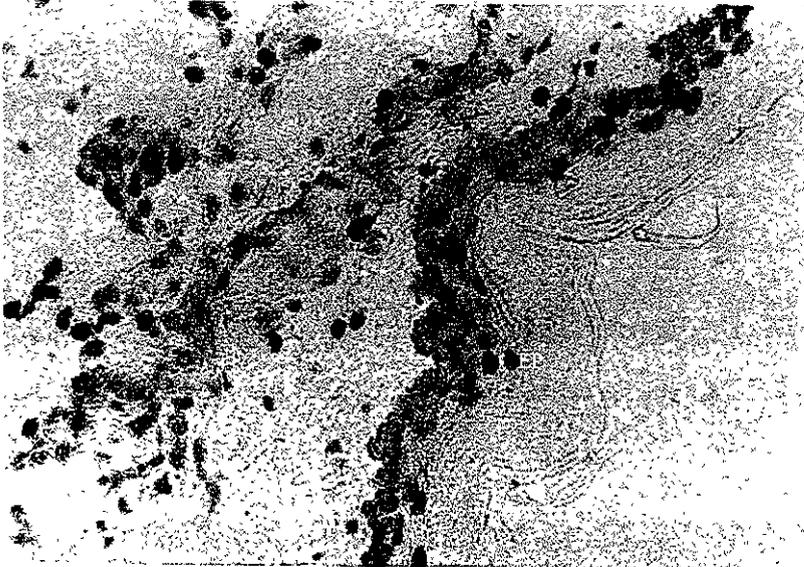
8

Figura 8. Ganglio de ratón extraído a los 7 días post-reinfección (H-E) 100X
LA linfocito activado
LD linfocito desactivado

Determinación de apoptosis en piel y ganglio regional

Se determinó la presencia o ausencia de células en apoptosis en el sitio de inoculación y en el ganglio regional de los ratones re infectados con *T. cruzi*, a través de la prueba de TUNEL. Las células en estado apoptótico se distinguieron por estar teñidas de color púrpura, tinción que corresponde al color que produce la degradación enzimática del cromógeno utilizado. La figura 9 muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos para las muestras problema de piel, en donde aparecieron teñidas una cantidad considerable de células por campo.

Uno de los controles utilizados en cada ocasión que se llevó a cabo el ensayo de TUNEL fue para determinar si la tinción obtenida era o no debida a la acción de fosfatasa endógena en el tejido. Para ello se utilizó un corte del mismo tejido al cuál se agregó solo el substrato para la enzima. La figura 10 muestra una imagen representativa de estos controles, en los cuáles se pudo observar que la intensa y esparcida tinción de la células en los tejidos problemas no se debe a la fosfatasa endógena que pudiese tener el tejido.

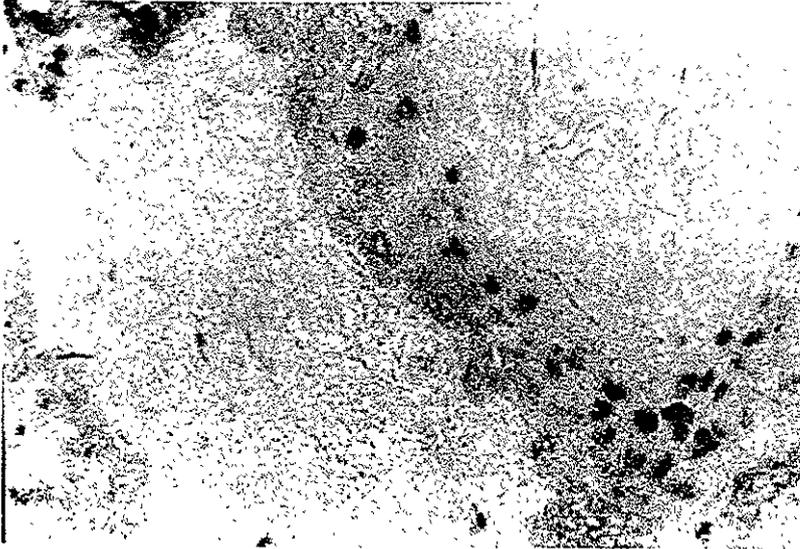


9

Figura 9. Piel de ratón extraída a los 15 post-reinfección (TUNEL) 400x

IP célula infiltrada positiva

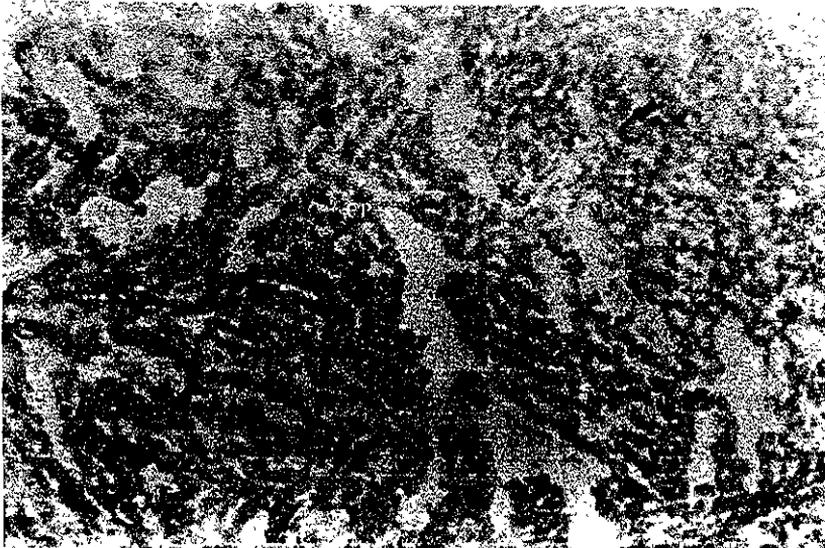
EP célula epitelial positiva



10

Figura 10. Piel de ratón extraída a los 15 días post-reinfección (control de fosfatasa endógena)
400x

En contraste con lo encontrado en piel, en los cortes de las muestras problema de ganglio solo algunas células presentaron reacción positiva a la reacción. La figura 11 es una imagen representativa de las muestras problema de ganglio, en donde es posible observar que solo algunas células y de forma no generalizada son positivas al ensayo de TUNEL.



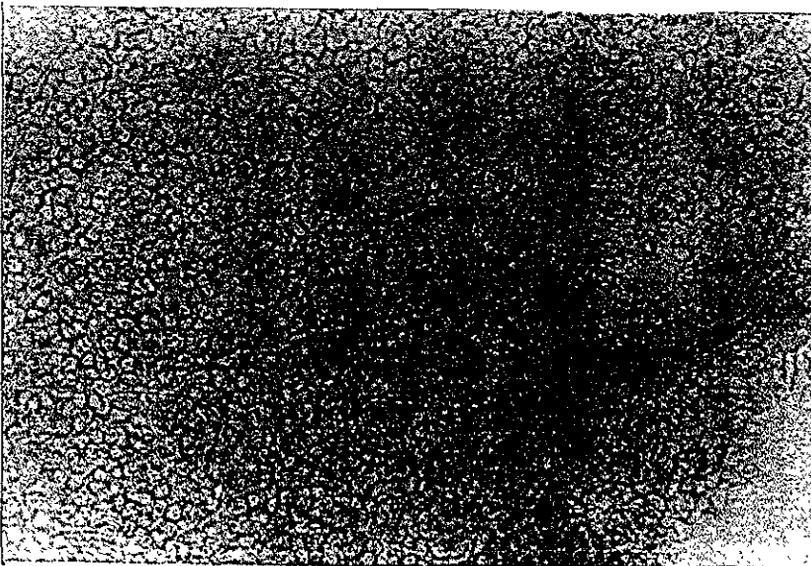
11

Fig 11 Ganglio de ratón extraído a los 15 post-reinfección (TUNEL) 250X

CP célula constitutiva positiva

Al igual que en piel, se utilizó un corte del mismo tejido en cada uno de los ensayos de TUNEL para ganglio a fin de evidenciar si la reacción obtenida se debía o no a la fosfatasa endógena del tejido.

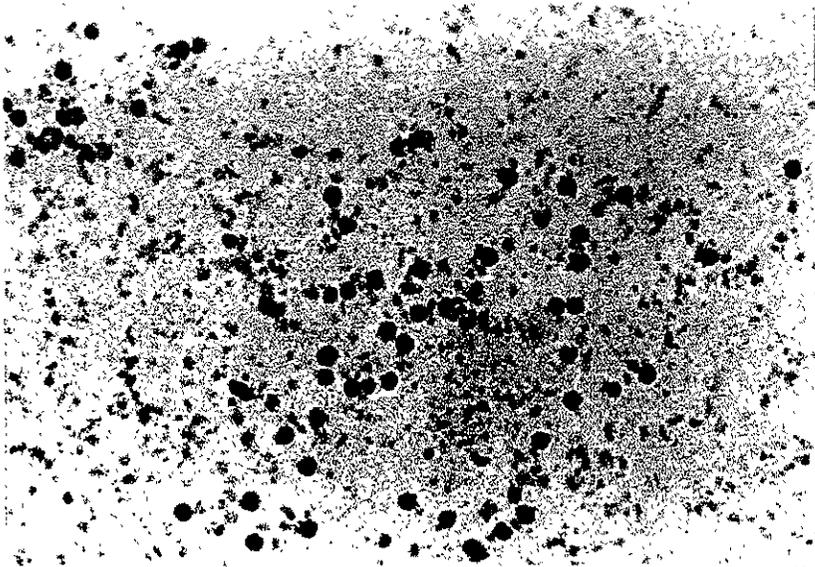
La figura 12 muestra un ejemplo de estos controles, en donde se puede observar que la fosfatasa endógena que pudiese tener el tejido no es la responsable de la reacción positiva en las células



12

Figura 12. Ganglio de ratón extraído a los 15 días post-reinfección (control de fosfatasa endógena) 400X

Con el fin de saber si el ensayo de TUNEL se llevó a cabo en las condiciones correctas se utilizó un control negativo y uno positivo. El control positivo consistió en células sanguíneas sometidas a la acción de DNasa a fin de comprobar la correcta incorporación de los nucleótidos en los fragmentos de DNA. Se observó una gran cantidad de células teñidas a lo largo de todos los ensayos de los distintos tiempos (figura 13)

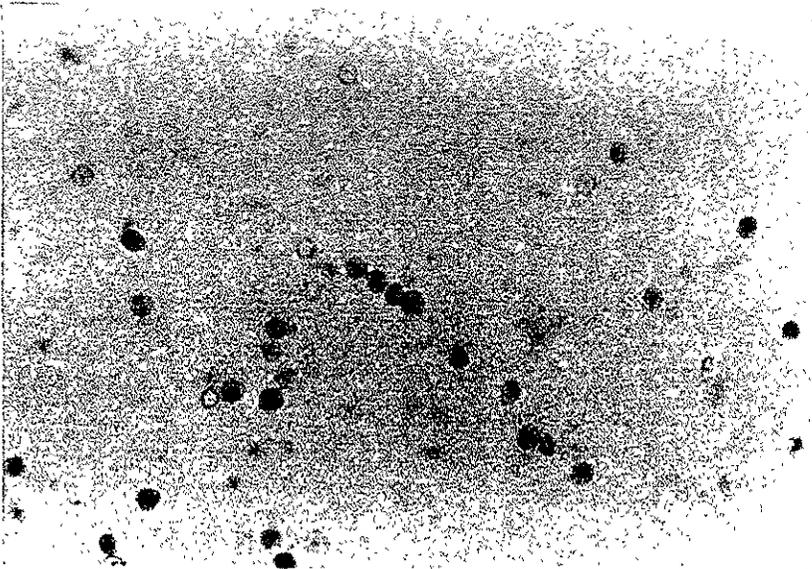


13

Figura 13. Control positivo para el ensayo de apoptosis en células de sangre periférica (TUNEL) 400X

SP célula sanguínea positiva

El control negativo del ensayo consistió nuevamente en células sanguíneas sin la incorporación de enzima. Se observó que las células se teñían solo en el citoplasma (fosfatasa endógena), pero el núcleo permaneció si teñir en todas las ocasiones (figura 14)



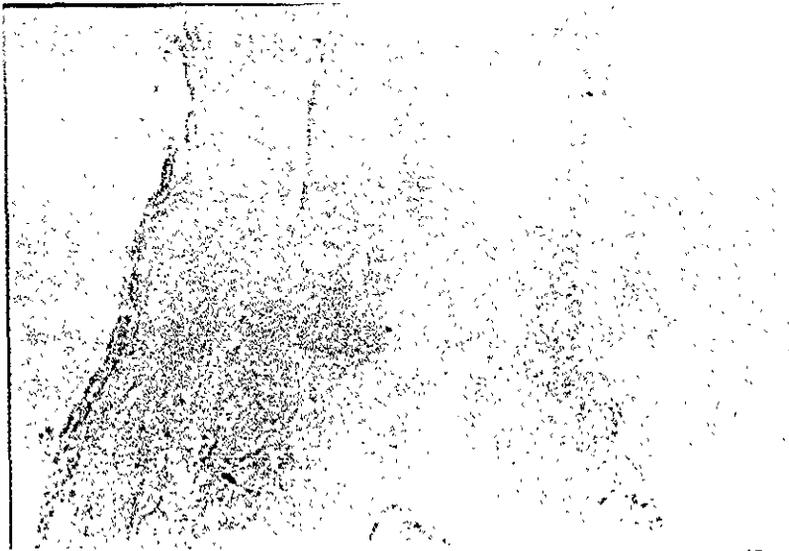
14

Figura 14 Control negativo para el ensayo de apoptosis en células de sangre periférica (TUNEL) 400X

SN célula sanguínea negativa

Para descartar la posibilidad de que la apoptosis pudiese estar siendo generada por el estímulo mecánico de la inoculación o por algún componente de la orina del triatomino que no fuese el parásito, se cortaron tejidos de ratones inoculados tres veces con orina no infectada y se sometieron a la prueba de TUNEL al igual que las muestras problema.

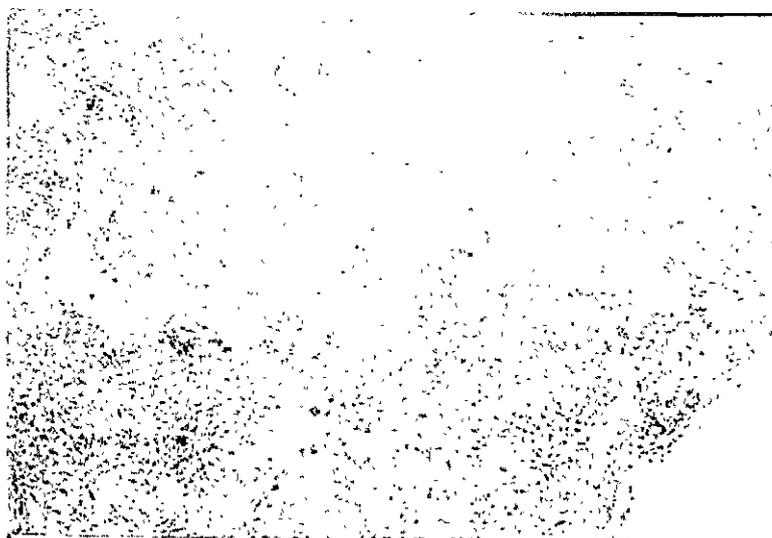
La figura 13 es una imagen representativa de los controles de piel en donde podemos apreciar que no existen células positivas a la reacción.



15

Figura 15. Piel de ratón control extraída a los 3 días post-inoculación (orina no infectada)
400X

Los controles de ganglio con orina no infectada mostraron al igual que en piel, que no existía ninguna reacción al ensayo ya que el tejido permaneció totalmente blanco (figura 16).



16

Figura 16. Ganglio de ratón control extraída a los 3 días post-inoculación (orina no infectada)
400X

Una vez que se determinó la presencia de células en apoptosis en los distintos tejidos problema, se calculó el porcentaje de células que se encontraron en este estado con respecto al total de células infiltradas en el caso de piel y para ganglio con respecto al total de células que lo constituyen. Porcentajes mayores fueron encontrados en piel comparados con los porcentajes obtenidos para ganglio (cuadro 8)

Cuadro 8. Porcentaje de células en apoptosis en piel y ganglio de ratones re infectados con *T. cruzi*

	Porcentaje de células apoptóticas en piel problema	Porcentaje de células apoptóticas en piel control	Porcentaje de células apoptóticas en ganglio problema	Porcentaje de células apoptóticas en ganglio problema
Día 0*	23 %	0	2.1%	0
1	22.6%	0	2.3%	0
3	21.5%	0	2.3%	0
7	23.5%	0	1.2%	0
15	14 %	0	nd	0
30	22.5%	0	nd	0

Los resultados son el promedio de 13 campos

Las observaciones se realizaron a un aumento de 400x

* muestra tomada un día antes de la 2ª. reinfección

Discusión.

La infección por *Trypanosoma cruzi*, al igual que la mayoría de los estímulos antigénicos, provoca en el hospedero una respuesta celular y humoral que es gran parte mediada por la acción de citocinas. En principio, el sistema inmune es capaz de elevar la eficiencia en esta respuesta cuando ha tenido un encuentro previo con el agente infeccioso (24). Para evaluar esto, en este trabajo primeramente se determinó la presencia del parásito en sangre periférica a fin de establecer si la infección había sido o no exitosa, además de obtener la cantidad de parásitos por mililitro y así poder comparar tal cantidad con la observada en una curva típica de parasitemia de ratones infectados. Como se puede observar en el cuadro 1, por observación directa el parásito no fue detectado en ninguno de los ratones a ningún tiempo, lo que se relaciona directamente con una carga parasitaria mucho menor a la encontrada en animales de primo-infección sujetos a un inoculo igual, calculándose alrededor de 400,000 y 500,000 parásitos por ml en el pico de una curva típica (61). Siendo la PCR una técnica para buscar la presencia del parásito mucho más sensible que la anterior, esta nos permitió encontrar DNA del parásito en casi todos los tiempos, con lo que se confirma su presencia en sangre periférica y por tanto la persistencia del parásito en animales inoculados en repetidas ocasiones (fig 2).

Al parecer, el parásito viaja o es eliminado de manera casi inmediata del sitio de inoculación después de su entrada, ya que no fue posible detectar DNA del mismo por PCR en la piel del cojinete plantar, mientras que en ganglio, se detecta al parásito en casi todos los tiempos, siendo la excepción el día 30 post-reinfección, tiempo en el que probablemente ya ha migrado a algunos otros tejidos tales como músculo esquelético y corazón (cuadro 2).

Comparando la respuesta de citocinas encontrada en animales de primo-infección con respecto a la encontrada en animales sometidos a dos reinfecciones, esta última mostró ser mas pobre en ambos tejidos (piel y ganglio) que la descrita para animales con solo una infección a los mismos tiempos, respuesta que de hecho también es baja (61). En piel solamente fue detectada la presencia de IFN- γ hasta los 7 y 15 días después de la reinfección (cuadro 3 y fig 3), dato que parece no ser acorde con la capacidad del sistema inmune de generar memoria, ya que la producción de citocinas por linfocitos Th debió de haberse presentado desde los primeros días y de forma más intensa. Este mismo fenómeno lo encontramos en ganglio, ya que ahí la respuesta se limitó a solo 2 citocinas IL-4 e IL-12 (cuadro 4 y fig 4). En el caso de la primera, esta sí apareció tempranamente, pero solo se mantuvo durante los tres primeros días después de la reinfección, para después desaparecer completamente. No es probable que la producción de esta citocina sea la causa de la completa inexistencia de IFN- γ e IL-2 o de la pobre e intermitente producción de IL-12, ya que existe evidencia fuerte que sostiene que la IL-4 por sí sola es incapaz de inhibir la producción de citocinas tipo Th 1, ya que requiere de la presencia de IL-10, con la que sinergiza para antagonizar con la respuesta Th 1 (8). A pesar de encontrar señal de IL-12 al primer día, esta desaparece para el día tres post-reinfección, lo que indica la falta de consistencia en su producción, con lo cuál la inducción de IFN- γ a través de esta estaría siendo igualmente afectada. IL-12 aparece nuevamente a los 7 y 15 días, sugiriendo nuevamente una estimulación tardía en un sistema con memoria inmunológica. Un factor que pudiese estar involucrado en la pobre producción de citocinas es la incapacidad de los macrófagos para producirlas. Recientemente se reportó la capacidad de los tripomastigotes metacíclicos de inhibir la producción de óxido nítrico por macrófagos, aún en presencia de IFN- γ , el cuál es un potente activador de los mismos (62), con lo cuál es probable que los tripomastigotes metacíclicos no

solo interfieran en la producción de óxido nítrico, sino también en la de otras moléculas producidas por los macrófagos tales como la interleucina IL-12, afectando de forma indirecta la de IFN- γ .

La semicuantificación a través de densitometría de las citocinas en ganglio mostró mayor cantidad de mRNA de IL-4, comparado con el de IL-12, aunque como ya se observó, la señal de IL-4 permanece durante menos tiempo. En general existe un incremento a través del tiempo en la señal de todas las citocinas amplificadas, incluyendo en la de IFN- γ encontrada en piel, lo que probablemente se deba a que el elemento o elementos que activan su producción, se vuelven más consistentes conforme transcurre la infección, ocurriendo lo mismo con la producción de la citocina para la cuál sirven de señal (cuadro 5 y 6). Es importante señalar que el objetivo en este trabajo fue básicamente descriptivo a fin de mostrar un panorama general de la producción de estos reguladores en ratones re infectados con *T. cruzi*, así, la semicuantificación de las mismas nos muestra solamente tendencias en la producción de citocinas con respecto a la producción de una proteína constitutiva, más no evidencia si existen o no diferencias significativas.

Los cortes teñidos con hematoxilina-eosina de piel, muestran un proceso inflamatorio importante (fig 5) en todos los tiempos registrados, incluyendo aquellos correspondientes a la muestra tomada antes de la última reinfección, lo cuál es lógico si se considera que para este tiempo, los animales ya habían recibido dos estímulos previos promoviendo dicho proceso inflamatorio. Se observó, tal como lo indica el cuadro 7, un incremento a lo largo de la primera semana después de la reinfección en el número tanto de mononucleares, como macrófagos y células plasmáticas, para comenzar a disminuir en los tiempos finales. Estos hechos indican por un lado, el establecimiento de una respuesta celular contra el estímulo, que a su vez debería de ser capaz de generar los

mensajeros importantes para una adecuada acción inmunológica contra el parásito, pero como ya se mencionó anteriormente, este hecho no se presenta. Y por otro lado, el reclutamiento importante de células plasmáticas (fig 6), sugiere la acción de una respuesta humoral y por tanto la liberación de anticuerpos en el sitio de inoculación, lo cuál podría explicar que el parásito no haya sido aquí detectado en este tejido, ya que una cantidad importante de parásitos estarían siendo lisados por complemento a través de anticuerpos líticos. Además, estos anticuerpos líticos son capaces de incrementar la fagocitosis debido a su habilidad para unirse a epitopes de tripomastigotes vivos (63), hecho que ayuda de manera fundamental a la eliminación del parásito y por tanto, contribuiría en la no detección del mismo. A pesar de desaparecer el parásito en piel, la inflamación persiste hasta el último tiempo registrado (30 días), esto puede deberse a una cinética de inflamación persistente debida a la aplicación de múltiples estímulos, en donde los factores quimiotácticos responsables de la respuesta inflamatoria continúan presentes en el microambiente generando la continua entrada de células al sitio de inflamación. Es probable que la reinfección sea la responsable de esta inflamación sostenida, ya que en animales de primo-infección, para la misma fecha (30 días post-inóculo), la inflamación básicamente ha desaparecido (61).

En ganglio, la tinción con H-E solo permite distinguir entre zonas en donde los linfocitos están en proliferación y zonas en donde no lo están. Así, en los cortes de ganglio de los ratones sujetos a dos reinfecciones con el parásito, encontramos zonas en donde los linfocitos se encuentran activados y en proliferación (zonas densamente teñidas), lo que sugiere una respuesta inmune en ganglio al estímulo antigénico provocado por las inoculaciones (fig 7 y 8).

Tanto en el caso de piel como de ganglio, este proceso inflamatorio es en su mayor parte es generado por el parásito, ya que en estudios anteriores en

donde se utilizó orina no infectada con *T. cruzi* de triatomíneos de la misma especie que la utilizada en este trabajo, se observó que la orina por sí sola no genera una respuesta inflamatoria tan intensa como la observada cuando el parásito está presente en la misma. Así, en los cortes de piel se observa mucho menos infiltrado que el presente en las muestras problema y en ganglio son casi imperceptibles las zonas de activación y proliferación de los linfocitos (64). Sin embargo; esto no implica que se requiera de la presencia del parásito para el mantenimiento de la inflamación tal como se discutió anteriormente.

Observando los resultados de apoptosis, es claro que al menos en piel, la cantidad de células que presentan reacción positiva es muy alta (fig 9), ya que en los controles en donde se utilizó orina que no contenía al parásito, ninguna célula mostró reacción positiva, con lo cual incluso porcentajes bajos encontrados en las muestras problema son importantes (fig 15). Además, se descarta la posibilidad de que esta reacción positiva pueda deberse a la presencia de fosfatasa endógena en los tejidos, debido a que el control utilizado en donde al tejido problema solo se le agregó el substrato revelador, muestra que solo unas cuantas células a lo largo de todo el tejido se tiñen débilmente (fig 10). En las muestras problemas sujetas al ensayo completo, se pudo observar que la apoptosis está afectando tanto a las células infiltradas como a las células epiteliales (fig 9), tal como lo ocurrido en la miocarditis chagásica en modelo canino, en donde no solo las células infiltradas, sino también los miocitos, estaban siendo afectados por muerte celular programada (49). Pero ya que en el presente trabajo nos enfocamos solo a aspectos de la respuesta inmune, las células que por obvias razones nos fueron de interés, son aquellas involucradas en la inflamación, así, encontramos que porcentajes considerables que van desde un 14% hasta un 23.5% de la población total de células infiltradas en el tejido y que son las responsables de la inflamación en la zona de internalización del parásito, entraron en apoptosis (cuadro 8). El hecho de que estas células

estén en apoptosis, implica la imposibilidad de las mismas para llevar de manera adecuada sus funciones, funciones que incluyen la producción de citocinas, hecho que sugiere, que la pobre (casi nula) producción de las mismas encontrada en el perfil realizado por RT-PCR pudiese deberse en gran parte a tal entrada de dichas células en muerte celular programada. Además, se ha demostrado que la fagocitosis de células apoptóticas desactiva macrófagos, a través de la producción de mediadores anti-inflamatorios como las prostaglandinas, así la apoptosis, pudiera estar afectando también de forma indirecta la producción de citocinas (57). Ya que en el tejido extraído antes de la última reinfección también se encontró un alto porcentaje de células en apoptosis, es obvio que el fenómeno se encontraba presente con anterioridad a la última reinfección, hecho que no es extraño si consideramos que la continua estimulación de los linfocitos los lleva a disfunciones inmunes tales como anergia o incremento en los niveles de apoptosis (42) y estos animales habían recibido dos inóculos anteriores a la extracción de la muestra de tejido (piel antes de la última reinfección). Aunque en este punto, es importante hacer notar que existe la posibilidad de que el fenómeno de la entrada en apoptosis de células involucradas en la respuesta inmune, no sea exclusivo de animales re infectados. Ya que la apoptosis es un mecanismo utilizado por el sistema inmune para remover las poblaciones expandidas y activadas de células T (24) y B (42), condición aprovechada y probablemente mediada por el parásito, existe la probabilidad de que también la apoptosis sea un evento que aparece en animales de primo-infección, ya que es necesaria solo una infección con *T. cruzi* para causar disturbios en la respuesta inmune tales como la activación policlonal de linfocitos T (51) y B (41); activación que requeriría de control por parte del sistema inmune del hospedero. Por ello, es de suma importancia realizar ensayos para buscar células en apoptosis en tejidos de animales sujetos a un solo inóculo e incluso en aquellos con una sola reinfección para determinar el momento en que el fenómeno de apoptosis aparece y se vuelve importante.

En el caso del ganglio regional, no se observó lo mismo que en piel con respecto a la cantidad de células en apoptosis, ya que aquí el porcentaje de células positivas con respecto al total de células que lo constituyen es muy pequeño, encontrándose entre 1.2% a 2.3% (cuadro 8 y fig 11), aunque los controles con orina no infectada (fig 16) y de fosfatasa endógena (fig 13) nuevamente no presentan células positivas a la reacción, por lo cuál incluso este pequeño porcentaje resulta importante. Ya que la producción de citocinas en ganglio es al menos un poco mayor que la encontrada en piel (cuadro 4 y 5), se sugiere una vez más un paralelismo entre producción de citocinas e inmunosupresión mediada por apoptosis. Pero debido a que la producción de citocinas sigue siendo baja con respecto a la encontrada en animales de primo-infección, es posible que en ganglio este actuando otro u otros eventos inmunosupresivos, dentro de los cuáles ciertamente no es la apoptosis el principal.

Es importante aclarar que el método utilizado en el presente trabajo para evidenciar apoptosis confiere tanto ventajas como desventajas. Este método provee información acerca de apoptosis en células de manera individual y permite la localización histológica de las mismas. Además, la sensibilidad de esta técnica es mayor comparada con la utilización de marcaje de moléculas de superficie o intracelulares de una célula en apoptosis, ya que la presencia de estas moléculas es muy limitada con respecto a la cantidad total de DNA sujeto a probable marcaje y más aún si el marcaje se hace directamente en un tejido ya que en este sistema es difícil distinguir entre una célula pobremente teñida y una normal. La mayor desventaja de esta técnica radica en la no discriminación entre apoptosis y un estado avanzado de necrosis, ya que en este último caso, una intensa ruptura de DNA también ocurre. Ya que la necrosis implica la liberación de una serie de enzimas proteolíticas de la célula al microambiente, lo

cuál tiene como consecuencia el daño masivo al tejido, es poco probable que lo observado en nuestros ensayos, sean células necróticas más que apoptóticas ya que al menos en piel el desarreglo y ruptura de las fibras de colágena sería muy evidente.

Retomando el hecho de que la carga parasitaria en sangre periférica fue mucho menor en los animales re infectados que la reportada en términos generales para animales de primo-infección, al grado de solo poder ser detectada la presencia del parásito a través de PCR, aunado al hecho que en trabajos anteriores se ha reportado un perfil de citocinas en suero de animales re infectados (64) muy parecido al encontrado en animales de primo-infección (61), es posible que el control de la parasitemia que fue observado en esta ocasión se deba principalmente a la acción más rápida y eficiente de anticuerpos, por lo cuál, en este particular aspecto, la memoria del sistema inmune si estaría proporcionando ventajas al hospedero en contra de la infección con *Trypanosoma cruzi*.

Conclusiones

- La parasitemia presentada por ratones sujetos a múltiples reinfecciones es menor que la presentada por ratones sujetos a solo un estímulo.
- La producción de citocinas en el sitio de inoculación y en el ganglio regional de ratones sujetos a múltiples reinfecciones es pobre y tardía.
- Existe una respuesta inflamatoria importante de tipo crónico en el sitio de inoculación de ratones sujetos a múltiples reinfecciones.
- El infiltrado de tipo inflamatorio en ratones sujetos a múltiples reinfecciones se compone principalmente de células mononucleares y células plasmáticas además de macrófagos en menor proporción
- En el sitio de inoculación (piel) de ratones sujetos a múltiples reinfecciones existen de manera constante en el tiempo células pertenecientes al infiltrado inflamatorio en estado apoptótico.
- En ganglio de ratones sujetos a múltiples reinfecciones se encuentran de manera constante en el tiempo algunas células que lo componen en estado apoptótico.

Literatura Citada

1. Velasco C.O. (1991). La enfermedad de Chagas: una revisión suscita y parcial de lo que ocurre en México y el Mundo. I.N.D.R.E. México. 3-6 pp.
2. Chester P, R Clifton and E Wayne (1992). Parasitología Clínica. 2ª Ed. Editorial Salvat, México. 241-242 pp.
3. Cruz L.O. (1987) Parasitología. Méndez Oteo, México. 159-172 pp.
4. Monteón V.M., J Furuzawa, R Alejandro, A Aranda, J.L. Rosales and P.A. Reyes (1996). American Trypanosomosis: *In situ* and Generalized Features of Parasitism and Inflammation Kinetics in a Murine Model. *Experimental Parasitology*, 83:267-274.
5. Kreier P.J. (1977) Parasitic Protozoa. Academic Press, New York, EUA. 146-155 pp.
6. Mendell G.L., R Gorder, D Benett and E John (1991) Enfermedades infecciosas: Principios y Práctica. 3ª edición. Ed. México Panamericana Argentina, 2205-2211 pp.
7. Tizard I (1985). Immunology and pathogenesis of tripanosomiasis. R.C. Press. E.U.A. 132-145 pp.
8. Abrahamsohn I.A., S.A. Galvao and R.L. Coffman (2000). Effects of Interleukin-4 Deprivation and Treatment on Resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 68(4):1975-1979

9. Antúnez M.I. and R.L. Cardoni (2000). IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunology Letters* 71:103-109
10. Aliberti J.C., M.A. Cardoso, G.A. Martins, R.T. Gazzinelli, L.Q. Vieira and J.S. Silva, (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection Immunology* 64:1961-1967
11. Zhang L and R.L. Tarleton (1996). Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by *in situ* immunocytochemistry: Lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *European Journal of Immunology*, 26:102-109.
12. Silva J.S., D.R. Twardzik and S.G. Reed (1991) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by Transforming Growth Factor- β (TGF- β). *Journal Experimental Medicine*, 174:539-545.
13. Reed S.G., C.E. Brownell, D.M. Russo, J.S. Silva, K.H. Grabstein and P.J. Morrissey (1994) Interleukin.10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology*, 153:3135-3140.
14. Mosmann T.R. and S Sad (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17:138-146
15. Zhang J, Z.A. Andrade, S Andrade, A Takeda, M Sadigurski and V.J Ferrans (1997). Apoptosis in a canine model of acute chagasic myocarditis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92 (suppl 1):107 (Abstract).

16. Scott P (1989). The role of Th1 and Th2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 68:369-372.

17. Gazzinelli R.T., F.T. Hakim, S Hieny, G.M. Shearer and A Sher (1991) Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in interferon-gamma production and protective immunity induced by attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *The Journal of Immunology*, 146:286-292.

18. Pearce E.J., P Caspar, J.M. Grzych, F.A. Lewis and A Sher (1991). Down regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic heminth *Schistosoma mansoni*. *Journal Experimental Medicine*, 173:159-166.

19. Torrico T, H Heremans and M.T. Rivera (1991). Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of Immunology*, 14(10):3626-3632.

20. Nabors G.S. and R.L. Tarleton (1991). Differential control of interferon-gamma and interleukin-12 production during *T. cruzi* infections. *Journal of Immunology*, 146:3591-3598.

21. Silva J.S., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, K.M. Moler, D Anderson and S.G. Reed (1992). Interleukin-10 and interferon-gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *The Journal of Immunology*, 140:4342

22. Cardillo F, J.C. Voltarelli, S.G. Reed and J.S. Silva (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: Role of NK cells. *Infection and Immunity*, 64:128-134.

23. Biron C.A. and R.T. Gazzinelli (1995). Effects of interleukin-12 on immune responses to microbial infections: A key mediator in regulating disease outcome. *Current Biology*, 7:485-496.
24. Goldsby R.A., T.J. Kindt and B.A. Osborne. *Immunology* (2000). Fourth Edition. Ed. W.H. Freeman and Company. New York, E.U.A. 670 p.
25. Majumder S and Kierzanbaum (1995) *Trypanosoma cruzi* immunosuppressive factor decreases the interleukin-2 mRNA level in cultured normal activated human lymphocytes. *Infection and Immunity*, 63:4546-4549.
26. Mejia L.H., M.K. Tanner, F Kierszebaum and M.B. Szein (1993). Alterations induced by *Trypanosoma cruzi* in activated mouse lymphocytes. *Parasite Immunology*, 15:273-280.
27. Eksi S, D.L. Wassom and M.R. Powell (1996). Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infections in mice: Profiles and compartmentalization of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 and IFN- γ -producing cells. *Journal of Parasitology*, 82:59-65.
28. Dutra ,W.O., K .J. Gollob, J.C Pinto-Días, G. Gazzinelli, R. Correa-Oliveira, R.L. Coffman and J.F. Carvalho-Parra (1997). Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals *Trypanosoma cruzi*-chronic infection. *Scandinavian Journal Immunology*, 45:74-80
29. Hunter C.A, T Slifer and F Araujo (1996). IL-10 is required to prevent immune hyperactivity durin infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infection Immunology* 64:2381-2386

30. Scott P (1993). Interleukin-12 initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*, 260:496-497
31. Silva J.S., J.C. Aliberti, G.A. Martins, M.A. Souza, J.T. Souto and M.A. Padua (1998). The role of IL-12 in *Trypanosoma cruzi* infection. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 31: 111-115
32. Ming M, M.E. Ewen and M.A. Pereira (1995). Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of TGF- β signaling pathway. *Cell*, 82:287-296.
33. Gazzinelli R.T., I.P. Oswald, S Hieny, S.L. James and A Cher (1992). The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-Arg-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor. *European Journal of Immunology*, 22:2501-2506.
34. Mosmann T.R. (1994) Properties and functions of interleukin-10. *Advances in Immunology* 56: 1-26
35. Hunter C.A., N.L. Ellis, T Slifer, S Kanaly., G Grunig, M. Fort, D. Rennick and F.G. Araujo (1997). IL-10 is required to prevent immune heperactivity during infection with *Trypanosoma cruz*. *Journal Immunology* 158:3311-3316
36. Stites D.P. and A.I. Teer (1993). *Inmunología básica y clínica*. 7ª edición. Ed. El Manual Moderno. 113-115 pp.
37. Melhorn H (1988). *Parasitology in focus*. Ed. Springer , Alemania. 633-635 pp.

38. Ramos C.E., L.M. Feoly, M Rodríguez, M Pérez and M Ortiz-Ortiz (1978). *T. cruzi*: immunosuppressed response to different antigens in the infected mouse. *Experimental Parasitology*, 45:190-197.
39. Cunningham D.S., R.E. Khun and E.C. Rowland (1978). Supresion of humoral responses during *T. cruzi* infection in mice. *Infection Immunology*, 22:155-162.
40. Kierszenbaum F (1981). On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunology*, 44:641-648
41. Minoprio P, S Itohara, C Heusser, S Tonegawa and A Coutinho (1989). Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite nonspecific responses and the activation of TcR I T cell. *Immunology Rev*, 122:184-206.
42. Zúñiga E, C Motran, C.L. Montes, F..L Díaz, J.L. Bocco and A Gruppi (2000). *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrest their proliferation during acute infection. *Clinical Experimental Immunology*, 119:507-515
43. Lopes M.F. and G.A. DosReis (1994). *Trypanosoma cruzi* induced immunosuppression: Blockade of costimulatory T-cell responses in infected hosts due to defective T-cell receptor CD3 functioning. *Infection and Immunity*, 62:1484-1488.

51. DosReis, G.A., M.F. Fonseca. and M.F. Lopes. (1995). Programmed T-cell death in experimental Chagas disease. *Parasitology Today*, 11:390-394
52. Lenardo M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis. *Nature*, 353:858-861.
53. Alderson M.R., T.W. Tough, T Davis-Smith, S Braddy, B Falk, K.A. Schooley, R.G. Goodwin, C.A. Smith, Ramsdell and D.H. Lynch (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death human T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 181:71-77
54. Van Parijs L and A.K. Abbas (1996). Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Current opinion in Immunology*, 8:355-361
55. Nunes M.P., R.M. Andrade, M.F. Lopes and G.A. DosReis (1998). Activation-induced T-cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts, *Journal of Immunology*, 160:1313-1319.
56. Freire-de-Lima C.G., M.P. Nunes, S Corte-Real, M.P. Soares, J.Q. Previato, L Mendonça-Previato and G.A. DosReis (1998). Proapoptotic activity of a *Trypanosoma cruzi* ceramide-containing glycolipid turned on the host macrophages by IFN- γ . *Journal of Immunology*, 161:4909-4916.
57. Fadok A, D.L. Bratton, A Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott and P.M. Henson (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* produce proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE-2 and PAF. *Journal Of Clinical Investigation*, 101:890-898.

58. Khan I.A., T Matsuura and L.H. Kasper (1996). Activation-mediated CD4+T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *International Immunology*, 8:887-896.
59. Ausubel F.M., B Roger, R.E. Kingston, D Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K Struhl (1997). *Short Protocols in Molecular Biology*. Vol 1. Third edition. Ed. Wiley and Sons, Inc. 1055 p.
60. Monteón V.M., P.A. Reyes, J.L. Rosales (1994). Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras experimentales por el método de reacción en cadena de la ADN polimerasa. *Archivos del Instituto Nacional de Cardiología*, 64:135-143.
61. Aragon S.J. (1998) Perfil de citocinas en la fase temprana de la enfermedad de Chagas en un modelo murino. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.
62. Camargo M, A.C. Andrade, I.C. Almeida, L.R. Travassos and R.T. Gazzinelli (1997) Glycoconjugates Isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* Species Membranes trigger Nitric Oxide Sintesis as well as microbicidal Activity in IFN- γ -Primed Macrophages. *Journal of Immunology*, 159:6131-6139
63. Lages-Silva E, L.E. Ramírez, A.U. Krettlí and Z Brener (1986) Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Parasite Immunology*, 9:21-30

64. Martínez A.L. (1999). Efectos de la reinfección en el perfil de citocinas que se presentan en la enfermedad de Chagas en modelo murino. Tesis Profesional. ENCB. IPN.

ESTA TESIS LE FUE ENTREGADA
DE LA BIBLIOTECA DEL