

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

TRYPANOSOMA CRUZI: EFECTO DE LA INFECCION  
EXPERIMENTAL EN RATONES SOBRE LA  
RESPUESTA INMUNE

TESIS PRESENTADA POR  
MARIA TERESA ORTEGA MATA  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN  
ANALISIS CLINICOS

MEXICO, D. F., DICIEMBRE DE 1974



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

16  
00



U N I V E R S I D A D  
D. E. M. E. X. I. C. O.

La elaboración de este trabajo se efectuó bajo la dirección  
del Dr. Librado Ortiz-Ortiz  
en el Departamento de Ecología Humana de la  
Facultad de Medicina  
de la U.N.A.M.

Agradezco profundamente al Dr. Luis F. Bojalil, Jefe del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M. el haberme permitido realizar esta tesis en ese Departamento. Al Dr. Librado Ortíz Ortiz, Coordinador de Investigación en el mismo Departamento, su valiosa dirección en el desarrollo de este trabajo. A los compañeros del laboratorio su empeñosa y solícita colaboración. - Al personal del Departamento de Ecología Humana las inmerecidas atenciones recibidas.

Por medio de estas líneas manifiesto mi reconocimiento sincero al Dr. José F. Herran, Director de la Facultad de Ciencias Químicas; al Dr. Francisco Javier Garfias, Jefe de la División de Estudios Superiores de la misma Facultad; al Dr. Carlos del Río y al Dr. Oscar Amor D. por su decidido apoyo y los esfuerzos realizados para llevar a cabo la institución de la Maestría en Ciencias con especialidad en Analisis Clínicos.

Deseo expresar mi gratitud y respeto a las autoridades del I.M.S.S., Institución de la que fué becaria. Al Dr. Luis Castelazo Ayala, Subdirector General - Médico del I.M.S.S. por haber otorgado la beca que me permitió realizar este trabajo. Al Dr. Oscar Hammeken M., Secretario General del Sindicato del I.M.S.S. por su valiosa intervención para obtener la beca. Al Dr. Pablo Mendoza Hernández, Director del H. de Infecciosos del Centro Médico "La Raza " y al Dr. Carlos Rivas Jefe del Laboratorio del mismo hospital, por haberme dado su aprobación para solicitar mi licencia.

## INDICE

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	8
RESULTADOS	20
DISCUSION	25
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA	33

## INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas constituye un problema de Salud Pública en varios países. Los redúvidos que transmiten Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi se encuentran diseminados en el Continente Americano y tanto en América del Norte como en América del Sur el 20 a 30% de los redúvidos están infectados.

La Organización Mundial de la Salud reportó en 1960, - casos de infección por este parásito en huéspedes mamíferos. A pesar de que en Estados Unidos de Norteamérica se ha encontrado T. cruzi en varios mamíferos, la incidencia de la enfermedad en el -- hombre es baja ya que los tipos de construcción de casa-habitación -- son menos favorables para el vector, opuesto a lo que ocurre en las zonas endémicas de América del Sur. También el hecho de que algu -- nas especies domésticas de redúvidos no suelen defecar en el momen -- to de la picadura puede explicar la poca frecuencia de la enfermedad en Norteamérica y en cambio los animales pueden infectarse al inge -- rir los insectos o lamer las heces infectadas depositadas en su pelu -- je.

La frecuencia más elevada de la enfermedad en el hom --

bre se observa en Brasil. En las zonas endémicas de América del Sur se ha estimado que el índice de frecuencia general es alrededor del 20% de la población "en riesgo", lo cual da un resultado aproximado de 7 millones de personas infectadas. Aproximadamente el 10% de las personas infectadas mueren durante la etapa aguda o sufren miocardipatía grave en la etapa crónica de la enfermedad.

En México se desconoce la frecuencia de las infecciones causadas por T. cruzi, pero las cifras de autopsia señalan el 0.2% de la población. Kóberle en Brasil, indica que las manifestaciones patológicas severas producidas por este parásito son la causa de la muerte en la tercera parte del material de autopsias (1-2).

La forma más común de infección se efectúa por medio de las heces del insecto transmisor, contaminadas con las formas metacíclicas de los tripanosomas y depositadas cerca del sitio de la picadura. Los parásitos penetran la piel lesionada o las membranas mucosas particularmente la conjuntiva ocular, causando una reacción inflamatoria local. La transmisión puede hacerse de individuo a individuo, de animal a animal (reservorio), de animal a hombre y viceversa. También puede ocurrir de insecto a insecto por coprofagia y canibalismo. Así mismo, las transfusiones de sangre han constituido un serio problema en las zonas endémicas ya que es posible observar

infecciones crónicas en sujetos sin antecedentes de etapas agudas y los pacientes, en ocasiones, son asintomáticos. También se han reportado casos de infección intrauterina y de lactantes por medio de la leche materna.

Dentro del huésped, la rápida propagación linfática del parásito produce una linfadenitis regional aguda y la diseminación hematológica causa un estado septicémico con metástasis. Los tripanosomas circulantes (tripomastigotes) abandonan los capilares después de cierto tiempo y penetran las células tisulares en donde se transforman inmediatamente en la forma intracelular de leishmania (amastigote), invadiendo de preferencia células del sistema retículo-endotelial, músculo cardíaco y células de la neuroglia. Estas formas intracelulares se multiplican por división binaria en una cavidad (pseudoquiste) y algunas se transforman en tripomastigotes. La célula huésped llena de parásitos se rompe, los tripanosomas que salen reinvasan la sangre y mantienen la infección penetrando dentro de nuevas células huésped. Las formas de leishmania no transformadas en tripanosomas permanecen en la vecindad de los pseudoquistes rotos, se desintegran y vienen a ser los responsables de las lesiones locales que pueden ser reacciones inflamatorias, lesiones degenerativas ó reacciones alérgicas (1-3).

La infección por T. cruzi presenta en el hombre una sintomatología muy variada que va desde una forma subclínica a una letal, en un período de tiempo que puede ser corto o largo. En niños menores de 5 años, sobre todo lactantes, aparecen con gran frecuencia signos y síntomas de meningoencefalitis que es frecuentemente fatal. En niños de mayor edad y en adultos la enfermedad puede tener una forma más benigna, subaguda o crónica que suele presentarse después de un ataque agudo.

Los síntomas de la infección generalizada pueden aparecer en el término de 4 días a 2 semanas o más después de la picadura del transmisor. La parasitemia persiste durante la etapa aguda. En más del 40% de los casos agudos aparecen cambios electrocardiográficos, -- taquicardia, arritmias e insuficiencia cardíaca. Un ataque agudo de -- enfermedad de Chagas puede ocasionar la muerte del paciente o bien -- puede cursar hacia la recuperación o entrar en la fase crónica de la infección.

La forma crónica presenta períodos variables de remisión y exacerbaciones con aparición de tripanosomas en sangre circulante, -- aunque también puede ser asintomática en el comienzo. En un gran -- porcentaje de pacientes crónicos, se observan alteraciones electrocardiográficas características. La dilatación del aparato digestivo consi-

derada como característica de la infección, es menos frecuente que el ataque cardíaco

La dificultad para establecer el diagnóstico de esta enfermedad es debida a las variaciones en las manifestaciones clínicas de la misma y ha provocado polémicas y diferencias de opinión entre médicos e investigadores que por muchos años la consideraron como una enfermedad rara. Actualmente, con los métodos de investigación biológica se ha podido comprobar la alta frecuencia de esta parasitosis. Sin embargo, la falta de recursos terapéuticos y preventivos hace relevante su importancia en la investigación. (1-2).

Para conocer los mecanismos de inmunidad a un parásito es necesario considerar su estructura, su variabilidad antigénica - relacionada con sus ciclos vitales complejos, su migración de un - medio tisular a otro, etc. La respuesta inmunológica como fenómeno de defensa o como factor contribuyente al efecto patogénico del - agente invasor, es de una importancia fundamental en la evolución de la enfermedad. La inmunidad adquirida a un parásito puede incluir mecanismos inmunitarios tanto humorales como celulares y producir diferentes efectos en el parásito y el huésped.

En el campo de la inmunología se han realizado estudios - sobre diferentes protozoosis. En animales infectados con T.

brucei se ha demostrado una inmunosupresión sistémica de anticuerpos específicos contra un antígeno heterólogo (4). También se ha reportado una respuesta inmune severamente abatida a un antígeno no relacionado inyectado durante la infección por Leishmania donovani (5). El mismo efecto ha sido observado en malaria (6). En el caso de la infección por L. donovani se encontró una respuesta inmune disminuída a pesar del incremento en los niveles de gamma globulina sérica (5).

Con todos estos antecedentes se pensó en la utilidad de investigar la respuesta inmune durante la infección con T. cruzi, especulando que podría estar alterada ya fuera en el lado aferente o en el eferente de la misma, ya que sabemos que: a) la destrucción de tejido asociada con la forma intracelular del parásito produce un daño severo e irreversible en el huésped; b) existen diferencias en las cepas de tripomastigotes de T. cruzi en su afinidad por tejidos específicos, por ejemplo reticulotrópicas y miotrópicas (3) y c) el hecho de que el sistema retículo endotelial, a pesar de estar parasitado por las cepas reticulotrópicas, actúa en una forma importante contra la infección (7).

El objeto de este trabajo fué el de estudiar el efecto de la infección con T. cruzi sobre la habilidad para formar anticuerpos -

contra un antígeno no relacionado. Para el caso se utilizó una cepa retículo-miotrópica y se determinó en ratones, a diferentes intervalos el número de células formadoras de anticuerpos (CFA) a eritrocitos de burro (EP). Se determinó también el índice fagocítico en otros ratones similarmente infectados. Los resultados fueron comparados con las respuestas de ratones normales.

Los resultados obtenidos indican que los ratones infectados con T. cruzi muestran una supresión de la respuesta inmune a un antígeno heterólogo. También se estudió el efecto de la infección producida por este parásito sobre la respuesta anamnésica y los resultados obtenidos mostraron una inmunosupresión significativa de la respuesta secundaria, tanto en los niveles de anticuerpo circulante como en el número de células formadoras de anticuerpo (CFA) a eritrocitos de burro (EB).

## MATERIAL Y METODOS

Ratones. En todos los experimentos se usaron ratones machos de la cepa Carworth Farm (CF1), con peso al iniciar los experimentos entre 12 y 16 gramos. Se mantuvieron en jaulas de plástico con rejilla metálica a una temperatura entre 16 y 20°C y se alimentaron con purina para ratones (Purina de México, S.A. de C.V.) y agua ad libitum.

Trypanosoma cruzi. Se usó una cepa mio y reticulotrófica de T. cruzi proporcionada por el Dr. F. Navarrete del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Guadalajara, Guadalajara Jal. y que se ha conservado por 2 años con virulencia estabilizada en el laboratorio de Inmunología del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

Glóbulos rojos de burro (EB). En todos los experimentos se utilizaron glóbulos rojos de un solo burro.

La sangre obtenida fué mantenida en solución de Alsever y conservada en el refrigerador (8). Los EB se lavaron 4 veces con una solución de NaCl 0.15 M y para su uso, se hizo una suspensión que con-

tenía  $1 \times 10^9$  células/ml en esta misma solución.

Preparación de la suspensión de leucocitos de bazo. Se extrajo el bazo de cada uno de los ratones y se depositó en una solución salina balanceada de Hanks (SSB). Cada bazo se procesó en forma individual. La suspensión celular se preparó en la misma solución por presión del órgano a través de una tela de acero inoxidable de 60 mallas/pulgada<sup>2</sup>. Las células esplénicas de cada uno de los ratones fueron colocadas en tubos de ensayo diferentes. Los eritrocitos se eliminaron con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0.83%. Los leucocitos se lavaron 3 veces con SSB y se llevaron al volumen deseado con esta misma solución.

Obtención de sueros para análisis serológicos. El suero para la determinación de anticuerpos fué colectado de todos los ratones cuyos bazos se emplearon para la investigación de células formadoras de anticuerpos en respuesta secundaria. El día del sacrificio se extrajo la sangre de la arteria axilar de cada uno de los ratones, se dejó coagular a la temperatura ambiente y se centrifugó. En cada grupo analizado, se reunieron los sueros de los animales infectados en un tubo y los sueros de los animales controles en otro y ambos se guardaron congelados para estudios serológicos.

Preparación del antisuero. Las células productoras de anticuerpos 7S (CFAI) se determinaron amplificando el sistema -- por la adición de anticuerpos contra globulina gamma de ratón (9,10). Este antisuero se preparó inmunizando conejos con globulina gamma de ratón. La globulina gamma fué obtenida por precipitación del suero de ratón normal con  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  . El proceso se realizó dos veces. Finalmente, se pasó por una columna de DEAE celulosa y fué fraccionada con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M a un pH de 8.0. Los conejos se inyectaron con 3 mg de globulina gamma de ratón agregada (calentada a  $63^\circ \text{C}$  por 20 minutos), mezclada con adyuvante completo de Freund (8). La inoculación se hizo en el cojinete plantar del conejo en los días 0 y 7. El día 14 recibieron la misma cantidad por vía subcutánea. El día 21 se sangraron los conejos y se hizo una prueba con el suero para buscar anticuerpos por el método de la doble difusión en agar. Las placas indirectas (CFAI) fueron detectadas por la adición de este antisuero a una dilución óptima de 1:100 y de complemento (suero fresco de cobayo diluido 1:10 ) en SSB.

Cuenta de parásitos. (i) Sangre: Los ratones parasitados fueron sangrados el mismo día del sacrificio. Se les -- limpió la cola con alcohol, se dejó secar y se cortó un pequeño pedazo

de la punta. Se tomó una pequeña cantidad de sangre con pipeta para cuenta de glóbulos blancos y se diluyó con NaCl 0.15 M que contenía heparina. El número de parásitos móviles por  $\text{mm}^3$  de sangre fué determinado en una cámara de Neubauer, ajustándose la cuenta a -- número de parásitos móviles por mililitro.

(ii) Tejidos: En el momento de la necropsia, los corazo nes de los ratones infectados y de los no infectados fueron extraídos - asépticamente y pesados. En los animales infectados se contaron los amastigotes de T. cruzi presentes en 1200 campos microscópicos de preparaciones de miocardio de  $6\mu$  de grosor. Estas secciones fueron cortadas en un crióstato y teñidas con hematoxilina (11). Se estudia -- ron 10 secciones diferentes de cada corazón de ratón.

Investigación de placas hemolíticas. El análisis de placas hemolíticas para determinar células productoras de anticuerpos (CFA) a eritrocitos de burro (EB) se llevó a cabo sobre láminas porta objetos como lo describió Golub y col. (12). Las placas directas -- (CFAD) detectadas después de la incubación exclusivamente con com plemento (13) se consideraron producidas por células liberadoras de anticuerpos 19S (IgM) y se determinaron 4 días después de la inocula - ción del antígeno. Las placas indirectas (CFAI) detectadas después -

del tratamiento con antisuero y complemento (9,10) se consideraron producidas por células formadoras de anticuerpos de baja eficiencia hemolítica (7S). Su determinación se llevó a cabo 10 días después de la administración del antígeno.

Grupos controles y grupos experimentales. Los grupos controles consistían de ratones normales inoculados con EB y otros que no recibieron antígeno y que fueron probados para determinar el número de células de fondo a diferentes intervalos después de la inoculación con  $2 \times 10^4$  parásitos de T. cruzi.

Los grupos experimentales para investigar respuesta primaria recibieron el antígeno antes o después de la inoculación con T. cruzi. La determinación del número de células formadoras de anticuerpo 19S (CFAD) tanto en animales normales como infectados, fué realizada en 10 grupos de 5 ratones cada uno a los días 1, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 23 y 25 después de la infección con T. cruzi. La determinación de células formadoras de anticuerpo 7S (CFAI) se llevó a cabo en 7 grupos de 5 ratones cada uno, tanto en animales normales como en infectados, a los días 1, 5, 8, 12, 15, 19 y 22 después de la infección con T. cruzi.

Los grupos experimentales para respuesta secundaria

recibieron el segundo estímulo antigénico antes o después de la infección con T. cruzi. La determinación del número de células formadoras de anticuerpos 19S y 7S, tanto en animales normales como infectados, fué practicada en 6 grupos de 5 ratones cada uno, a los días 3, 10, 15, 20, 25 y 29 después de la infección.

Procedimiento experimental para estudiar el efecto de la infección con T. cruzi sobre la respuesta inmune.

A) Respuesta primaria

(a). La infección de los grupos experimentales se realizó con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes (51.6 LD<sub>50</sub>), inoculados por vía intraperitoneal (día cero).

(b). La inmunización se efectuó con 0.5 ml de la suspensión del antígeno ( $1 \times 10^9$  EB/ml) por vía intraperitoneal. Para determinar células formadoras de anticuerpos 19S (CFAD) los animales fueron sacrificados 4 días después de la inmunización. Para la determinación de placas indirectas 7S (CFAI), los ratones fueron sacrificados 10 días después de la administración del antígeno.

(c). El día señalado para el sacrificio los ratones infectados y controles fueron sangrados y sacrificados. Se extrajeron los bazos y se procesaron por separado. En estas suspensiones celulares

se determinó el número de células viables/ml por el método de exclusión con azul Tripano utilizando una cámara de Neubauer y pipetas para cuenta de glóbulos blancos (14).

(d). La determinación de CFA se realizó colocando tubos de 12 X 75 mm que contenían 0.4 ml de agarosa al 0.5% en SSB en un baño María a 42° C. A cada tubo se le adicionó 0.05 ml de una suspensión de EB al 10% en SSB y 0.1 ml de la suspensión de células de bazo en estudio. Se agitó el tubo brevemente y se depositó la gelosa sobre una lámina porta objetos previamente barnizada con Agar Noble (Difco, Detroit, Mich. ) al 0.1% en una solución de NaCl 0.15 M. Estas láminas se incubaron durante una hora a 37° C, colocándolas en placas especiales y dentro de cajas de plástico, en una atmósfera húmeda. A las láminas para estudio de anticuerpos 19S (CFAD) se les adicionó el complemento (suero fresco de cobayo diluido 1:10 en SSB) y se incubaron nuevamente, durante dos horas.

(e). A las placas de agar usadas para determinar células formadoras de anticuerpos 7S (CFAI), se les adicionó anti-globulina gamma de ratón a la dilución óptima predeterminada (1:100), después de la primera incubación (9,10). A continuación se incubaron nuevamente durante 60 minutos a 37° C, después se añadió el complemento y se incubaron 60 minutos más.

(f). Se contaron las placas de lisis en las láminas porta --

objetos con la ayuda de un contador de colonias. El análisis de placas hemolíticas fué llevado a cabo por cuadruplicado en cada bazo. Se calculó el número de células formadoras de placas por  $10^6$  de -- células de bazo, según la técnica de Golub y col. (12).

(B) Respuesta secundaria

(a). La primera inyección de 0.5 ml de la suspensión de -- glóbulos rojos de burro por vía intraperitoneal se llevó a cabo un mes antes de la infección con T. cruzi.

(b). Antes de recibir el segundo estímulo, se hizo un análisis de CFAD y CFAI en un grupo de ratones inmunizados primariamente con EB.

(c). La infección de los grupos experimentales de ratones se realizó el día cero (30 días después de la primera inyección de EB) con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes inoculados por vía intraperitoneal.

(d). La segunda inyección del antígeno (EB), en igual cantidad y por la misma vía que la primera, se practicó 5 días antes del - sacrificio en cada grupo que comprendió 5 ratones infectados y 5 normales.

(e). El día del sacrificio (3, 10, 15, 20, 25 y 29 días después --

de la infección), se sangraron los ratones infectados y normales y se extrajeron los bazos. Cada bazo se procesó por separado para obtener las suspensiones celulares esplénicas de cada animal. A estas suspensiones celulares se les hizo cuenta de células viables en cámara de Neubauer, como se mencionó anteriormente.

(f). El plaqueo se llevó a cabo en la misma forma que se hizo para la respuesta primaria, determinando tanto placas directas 19S (CFAD) como indirectas (CFAI).

Actividad fagocítica. Con el propósito de estudiar la actividad fagocítica, grupos de ratones controles y grupos de ratones infectados con T. cruzi fueron probados a diferentes intervalos después de la infección, por una modificación del método descrito por Biozzi y col. que se basa en la eliminación de carbón coloidal de la circulación (15). La cantidad de carbón coloidal eliminada de la circulación se tomó como una medida de la actividad fagocítica del sistema retículo-endotelial (16). Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con una suspensión de tinta China (CII-143-1A, Gunther Wagner, Pelikan -- Werke, Hanover, Germany) que contenía 55mg/ml, pH 7.3-7.4. La dosis usada se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: dosis en ml = peso corporal/100. Tres minutos después de la inyección de --

carbón coloidal se obtuvieron muestras de sangre de 0.02 ml de cada uno de los ratones, por punción del plexo venoso retro-orbital.

La cantidad de carbón se estimó en un espectrofotómetro Zeiss, ELKO III, a una longitud de onda de 490 nm, comparando la densidad óptica obtenida en el mismo animal antes y después de la inyección del material. Los datos obtenidos en los grupos infectados fueron comparados con los observados en los grupos de animales con troles no infectados.

Determinación de anticuerpos anti-eritrocitos de burro en el suero.

(A) Anticuerpos totales. Los sueros de cada grupo experimental y control correspondiente, se inactivaron a 56°C durante 30 minutos y se les determinó la presencia de anticuerpos contra glóbulos rojos de burro (EB) por el método del 50% de hemólisis (8).

(a). Se hicieron diluciones seriadas de estos sueros. En cada tubo se colocó 0.1 ml de suero diluido.

(b). Se añadió 0.1 ml de glóbulos rojos de burro (EB) -- lavados, a una concentración de  $1 \times 10^9$  células/ml y se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

(c). Se les adicionó 0.2 ml de complemento (1:30) y se incubaron nuevamente a 37° C durante 60 minutos .

(d). Se les agregó 2 ml de buffer veronal. Se centrifugaron los tubos a 1500 r p m durante 15 minutos y se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro Zeiss, ELKO III, a una longitud de onda de 541 mμ.

Todas las pruebas se hicieron por duplicado y usando controles . La actividad de los anticuerpos está dada en unidades de 50% de hemólisis por mililitro de suero .

(B) Tratamiento con 2-mercaptoetanol (2-ME). La fracción del suero total con actividad de hemolisinas resistentes al tratamiento con 2-ME 0.1 M, se determinó al mismo tiempo que la actividad de anticuerpos totales. Las inmunoglobulinas sensibles al 2-ME se consideran anticuerpos con una constante de sedimentación de 19S (17). La diferencia -- entre la actividad de hemolisinas totales y la actividad de hemolisinas resistentes al 2-ME representan anticuerpos 19S.

El tratamiento con 2-ME fué llevado a cabo diluyendo los sueros 1:2 en una solución de NaCl 0.15 M, y dializando durante 24hr a la temperatura ambiente contra una solución 0.1 M de 2-ME diluido

en NaCl 0.15 M. Después del tratamiento con 2-ME las muestras de suero se dializaron durante 18 hr a 0° C contra iodoacetamida 0.01 M en una solución de NaCl 0.15 M. Finalmente las muestras se dializaron a 0° C durante 24 hr contra una solución amortiguadora de barbital modificado, pH 7.4, efectuando cambios repetidos de esta solución (18). Este material fué utilizado para la determinación de hemolisinas resistentes al 2-ME (7S).

## RESULTADOS

Determinación de niveles de parásitos a diferentes intervalos después de la infección de ratones con T. cruzi: (i) Cuenta de parásitos en sangre. Las cuentas de parásitos en la sangre de ratones infectados con tripomastigotes de T. cruzi se muestran en la Tabla I. Los tripomastigotes se observaron en todos los ratones 24 hr después de la infección. El número de parásitos aumentó en el curso del experimento llegando a su máximo el día 23.

(ii) Cuenta de parásitos en músculo cardíaco. En los corazones de los ratones infectados se observaron inicialmente nidos - con formas de amastigotes, el día 9 después de la infección. El número de nidos observados después de examinar 1200 campos microscópicos aumentó después de 9 días. Este aumento se manifestó claramente 18 días después de la infección (Tabla I). Posteriormente - el número de nidos en el tejido del miocardio disminuyó. Por otro lado, el peso del corazón de los ratones infectados presentó un incremento gradual durante todo el experimento. La diferencia en el peso de los corazones entre el grupo control y el infectado observada des

pués de 18 días de infección, fué significativa (Tabla I).

Determinación de actividad fagocítica en animales infectados con T. cruzi. Los experimentos de eliminación de carbón coloidal demostraron que la actividad fagocítica fué mayor en los grupos infectados que en los no infectados. A partir del día 5 esta diferencia fué significativa ( $P < 0.01$ ). La actividad fagocítica aumentada de los animales infectados se mantuvo durante todo el experimento (Tabla II).

Determinación de células formadoras de anticuerpos (CFA) en ratones no inmunizados, después de la infección con T. cruzi. Las células formadoras de anticuerpos contra eritrocitos de burro en ratones no inmunizados e infectados con T. cruzi se determinaron los días 1, 4, 7, 10, 14, 16, y 18 después de la infección. Aunque la parasitemia - en estos animales fué progresiva a lo largo del experimento, no se --- observaron más de 6 células sintetizando anticuerpos en  $10^6$  analizadas, tanto de CFAD (19S) como de CFAI (7S).

Respuesta primaria de células formadoras de anticuerpos 19S (CFAD) en ratones inmunizados con eritrocitos de burro a diferentes intervalos antes y después de la inoculación con T. cruzi. Para determinar el efecto de T. cruzi sobre la respuesta inmune primaria contra eritrocitos de burro, se examinaron los ratones a intervalos

diferentes durante 25 días después de la infección. Las CFAD no mostraron diferencias entre los ratones normales y los infectados durante los primeros 9 días. Sin embargo, a partir del día 11 hasta el final del experimento, los ratones infectados mostraron una disminución significativa en el número de CFAD cuando se les comparó con ratones normales no infectados ( $P < 0.01-0.001$ ) (Tabla III).

Respuesta primaria de células formadoras de anticuerpos 7S (CFAI) en ratones inyectados con eritrocitos de burro a diferentes intervalos, antes o después de la inoculación con T. cruzi. Las CFAI en ratones infectados con T. cruzi e inmunizados con eritrocitos de burro a intervalos diferentes, no mostraron cambios significativos durante los primeros 12 días del experimento. Del día 15 en adelante el grupo infectado mostró una disminución significativa en CFAI (Tabla IV). La disminución en CFAI (7S), fué observada casi al mismo tiempo que la disminución en la respuesta de CFAD (19S) (Tabla III).

Respuesta secundaria en ratones estimulados con eritrocitos de burro a diferentes intervalos antes o después de la inoculación con T. cruzi. Como se puede ver en la Fig. 1, las células formadoras de anticuerpos 7S (CFAI) en ratones infectados con T. cruzi y

reestimulados con eritrocitos de burro a diferentes intervalos, no -- mostraron cambios significativos los 3 primeros días del experimento, Sin embargo, el día 10 el grupo infectado mostró una disminución significativa en el número de CFAI ( $P < 0.01$ ). Esta disminución en CFAI fué mayor en los siguientes días de la infección con T. cruzi ( $P < 0.001$ ). Los ratones usados en este experimento y que habían sido inmunizados con eritrocitos de burro 30 días antes de la infección no contenían --- CFAI al inicio del experimento.

Hemolisinas del suero. Los anticuerpos contra eritrocitos de burro - en los sueros de los ratones infectados con T. cruzi mostraron esencialmente un patrón de respuesta similar a la observada en la investigación de CFAI (Fig. 2). Los títulos de anticuerpos totales así como los títulos de anticuerpos 7S en los grupos controles no infectados que solamente recibieron las dos inyecciones de eritrocitos de burro, no mostraron gran variación durante todo el experimento. Por otro lado, aunque los títulos de hemolisinas totales en el suero de ratones infectados con T. cruzi no fueron diferentes de los de los ratones no infectados en los 10 primeros días después de la infección, disminuyeron en estos ratones infectados después del día 10. El día 15 se observó un descenso significativo en el título de hemolisinas y este título continuó disminuyendo a medida que transcurría el tiempo de infección.

Cuando estos mismos sueros se trataron con 2-ME, los títulos de hemolisinas 7S estuvieron también disminuídos en igual forma que los descritos en los sueros no tratados con 2-ME.

Determinación de la LD<sub>50</sub> de la cepa de tripomastigotes de T. cruzi. Para determinar la dosis letal de tripomastigotes necesaria para matar el 50% de los ratones en un período de 30 días (L D<sub>50</sub>/30 días), se usó el sistema de Reed and Muench (19). La dosis LD<sub>50</sub> resultó ser de 387 tripomastigotes/animal. Esta dosis conduce a la muerte a la mitad de los animales en 30 días. Nosotros usamos un inóculo que contenía 20,000 tripomastigotes/animal o sea una dosis letal 100% (51.6 veces la LD<sub>50</sub>). En los grupos de ratones que recibieron un inóculo diez veces menos infectante, de 2000 ó 200 tripomastigotes, el porcentaje de mortalidad a los 30 días fué de 80% y 38% respectivamente.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en estos estudios sobre el efecto que tiene la infección experimental con T. cruzi en la respuesta inmune primaria y secundaria a un antígeno heterólogo indican la existencia de un estado de inmunosupresión. En ambos casos la supresión se observó entre el 5° y 7° día después de la infección. En esos días el número de parásitos en la sangre era aproximadamente de  $1 \times 10^5$  tripomastigotes/ml.

La necesidad de usar eritrocitos de burro fué debida a que ha sido demostrado que el suero de conejos infectados con T. brucei contiene aglutininas heterófilas (20) para los eritrocitos de borrego, aunque ratones similarmente infectados no las contienen (4). Por lo tanto, el uso de eritrocitos de burro elimina la posibilidad de antígenos de reacción cruzada en los ensayos de células formadoras de anticuerpos (CFAD y CFAI).

Los análisis de CFAD y CFAI llevados a cabo en ratones infectados con T. cruzi pero no inmunizados con eritrocitos de burro, revelaron solamente  $6 \times 10^6$  CFAD ó CFAI. Este número de células

formadoras de anticuerpos fué similar en los ratones poco parasitados y en los altamente parasitados que no habían sido inmunizados con EB.

El efecto inmunosupresor en la respuesta primaria y secundaria llega a ser más evidente cuando el número de parásitos aumenta tanto en la sangre periférica como en el tejido del músculo cardíaco. En cambio, no hubo respuesta disminuida de CFAD ó CFAI en los estados iniciales de la infección, cuando el número de parásitos en sangre estaba por abajo de  $1 \times 10^6$  tripomastigotes/ml y aún no se observaban nidos de amastigotes en músculo cardíaco (Tablas III y IV).

Es interesante observar que en los ratones infectados con T. cruzi la actividad fagocítica fué mayor que la observada en los ratones no infectados. Se sabe que los macrófagos juegan un papel importante en la respuesta inmune (21, 22), era por tanto lógico esperar que la respuesta inmune a antígenos particulados como el usado en este trabajo (eritrocitos de burro), fuera normal. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los animales infectados presentan un número significativamente disminuido de células formadoras de anticuerpos.

El efecto inmunosupresor ejercido por varios agentes

infectantes sobre la respuesta inmune es bien conocido (4, 5, 23 - 27). Sin embargo, el mecanismo exacto de esta inmunosupresión se desconoce. Se han postulado varias hipótesis para explicar la inmunosupresión observada durante infecciones por protozoarios, pero hasta ahora han sido inadecuadas ya que los eventos que siguen a la administración del antígeno son extremadamente complejos (4, 5, 28). Los protozoarios pueden inducir inmunosupresión a diferentes niveles. Por ejemplo, Strikland y col. (28), han reportado en ratones infectados con Toxoplasma gondii una depresión de la respuesta de IgM a eritrocitos de borrego. Por otro lado, infecciones por Plasmodium berghei en ratones, produce una marcada reducción de la respuesta inmune primaria y secundaria a eritrocitos de borrego, la cual coincide con el aumento de la parasitemia (23, 24, 29). Infecciones debidas a otras especies de tripanosoma y sus efectos sobre la respuesta inmune, han demostrado un comportamiento variable. Por ejemplo, la infección por T. gambiense daña no solamente la respuesta inmune humoral sino también la respuesta inmune mediada por células (25). En este tipo de tripanosomiasis la parasitemia observada es baja. Sin embargo, la infección por T. brucei en ratones produce ambas, una alta parasitemia y una severa alteración de la función del sistema retículo-endotelial que se traduce en una falla de la respuesta humo-

ral y una ligera reducción en la inmunidad mediada por células (26). Además, T. rhodesiense (Nyoriana), casi en las mismas condiciones experimentales de nuestros estudios, induce muy elevados niveles de parasitemia (tan altos como  $4 \times 10^8$  parásitos por ml) y no tiene ningún efecto o muy poco, sobre la respuesta de anticuerpos (30). Como podemos ver, las infecciones producidas por diferentes especies de tripanosoma inducen diferentes efectos sobre la respuesta inmune.

No tenemos todavía una explicación plausible del mecanismo de inmunosupresión a eritrocitos de burro en ratones infectados con T. cruzi. Sin embargo, nuestros resultados no indican que el bloqueo del sistema retículo-endotelial sea el responsable de la respuesta disminuida como fué sugerido previamente (4, 5, 31), ya que la actividad fagocítica del sistema retículo-endotelial está aumentada en los animales infectados. También se sabe que las infecciones por T. cruzi pueden afectar severamente el bazo (32, 33). Se ha sugerido que la competencia antigénica (fenómeno que produce respuesta humoral disminuida) juegue un papel en esta inmunodepresión, aunque no siempre se ha observado inmunosupresión en condiciones similares a las aquí reportadas, en infecciones por otros protozoarios (24). Además, en estos ratones infectados con T. cruzi los requerimientos

de tiempo para que ocurra la máxima competencia antigénica pueden no ser satisfactorios, ya que Eidinger y col. (34), demostraron que se necesitan intervalos de tiempo apropiados entre las inyecciones -- de los dos antígenos.

El hecho de que la inmunosupresión ocurra en enfermedades producidas por diferentes microorganismos (23), indica que debe existir un común denominador en su efecto sobre la respuesta inmune. Por ejemplo, se ha discutido que los organismos en proliferación pueden liberar sustancias metabólicas que pueden de alguna manera ser deletéreas para los linfocitos inmunocompetentes (5). En el caso de la infección por leishmania se ha demostrado un aumento - significativo en la globulina gamma del suero (5), lo que podría implicar la formación de complejos antígeno-anticuerpo los cuales podrían ser responsables de la supresión (35). El requerimiento de que la - globulina debe ser específica para el correspondiente antígeno no ha - sido establecido plenamente (36). Sin embargo, se ha demostrado -- que la gran concentración de globulina gamma que se produce durante una infección por leishmania no es específica para antígenos homólogos, aunque los anticuerpos a tejidos autólogos pueden existir y se han encontrado depósitos amiloides en el riñón (37).

Otro mecanismo potencial que puede tomarse en cuenta en la inmunosupresión es el papel del interferón, ya que estas infecciones por protozoarios presentan una fase intracelular obligada. La estimulación de producción de interferón por estos parásitos en la misma forma que los virus, es una posibilidad que no puede ser eliminada. Por ejemplo, en un reporte reciente Chester, Paucker y Merigan (38) han demostrado in vivo, la influencia inmunosupresora del interferón exógeno de ratón para las células productoras de anticuerpos en ratones inmunizados con eritrocitos. Además se ha demostrado que el interferón inhibe la síntesis de DNA inducida por fitohemaglutinina o por células alogénicas (39). En estas condiciones el interferón puede, de alguna manera, modificar la función de los linfocitos, tanto los derivados del timo como los derivados de la médula ósea. Por lo que respecta a una posible alteración de la función de linfocitos "T" y "B" por el interferón, se ha reportado que la incidencia de enfermedades autoinmunes es extraordinariamente baja en aquellos países en los cuales se observan problemas de parasitismo múltiple e intenso (40). A este respecto es importante señalar que las infecciones por tripanosoma reducen la severidad de neuritis alérgica experimental en conejos (41).

## CONCLUSIONES

El efecto de la infección experimental con T. cruzi en ratones sobre la respuesta inmune primaria y secundaria a eritrocitos de burro, se tradujo en una inmunosupresión significativa de inmunoglobulinas 19S y 7S. La determinación de células formadoras de anticuerpos (CFA) en animales infectados mostró una reducción significativa 10 días después de la infección. La supresión de anticuerpos fué mayor a medida que se incrementaron la parasitemia y la presencia de nidos de amastigotes en el músculo cardíaco. Resultados similares se observaron en los sueros de los ratones infectados con este parásito, donde el título de anticuerpos determinado por hemólisis estuvo también disminuído a lo largo del experimento. Los ratones no infectados y que fueron inmunizados con eritrocitos de burro, no mostraron cambios importantes en el número de CFA ó en el título de anticuerpos séricos durante el desarrollo de los experimentos. Por lo tanto podemos concluir que la infección aguda por T. cruzi en ratones presenta las siguientes características:

1. Niveles elevados de parasitemia en los animales de --

experimentación después del quinto día de infección.

2. Supresión de la respuesta inmune humoral tanto primaria como secundaria, a un antígeno no relacionado (eritrocitos de burro), inyectado a diferentes intervalos antes o después de la infección con T. cruzi

3. Aumento de la actividad fagocítica posiblemente producida a través de mecanismos inmunes mediados por células.

Los datos obtenidos de la respuesta inmune primaria y secundaria sugieren que la infección por T. cruzi tiene un efecto sobre el lado eferente de la respuesta inmune.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Markell-Voge, *Parasitología Médica*, p.91  
Nueva Editorial Interamericana, México, 1973
- 2.- Köberle, F., Chagas' disease and Chagas' syndromes:  
The pathology of american trypanosomiasis  
*Adv. Parasitol.*, 6:63, 1968.
- 3.- Goble, F.C. En *Biology of Parasites*. E.J.L.  
Soulsby (Ed.), p. 237, Academic Press, New York, 1966.
- 4.- Goodwin, L.G., Green, D.G., Guy, M.W., y Voller, A.  
Immunosuppression during trypanosomiasis. *Br. J.*  
*Exp. Path* 53:40, 1972.
- 5.- Clinton, B.A., Stauber, L.A., y Palczuk, N.C.  
Leishmania donovani: Antibody response to chicken  
ovalbumin by infected golden hamsters.  
*Exp. Parasitol.*, 25:171, 1969.
- 6.- Salaman, M.H., Wedderburn, N., y Bruce-Chwatt, L.J.,  
The immunodepressive effect of a murine plasmodium  
and its interaction with murine oncogenic viruses.  
*J. Gen. Microbiol.*, 59:383, 1969.
- 7.- Yanovsky, J.F., Traversa, O.C., Taratuto, A.L.,  
Schumnis, G.A., González Cappa, S.M., y Parodi, A.S.  
*Trypanosoma cruzi*: Experimental immunization of  
mice. *Exp. Parasitol.*, 26:73, 1969.
- 8.- Campbell, D., Garvey, J., Cremmer, N., y Sussdorf,  
D., *Methods in Immunology*, p.244, 118, 190.  
W.A. Benjamin, Inc., New York, 1963.
- 9.- Dresser, D.W., y Wortis, H.H. Use of an  
antiglobulin serum to detect cells producing

- antibody with low haemolytic efficiency. *Nature* (Lond.), 208:859, 1965.
10. - Sterzl, J., y Riha, I. A localized haemolysis in gel method for the detection of cells producing 7S antibody. *Nature* (Lond.), 208:858, 1965.
  11. - Fernández, J.F., Castellani, O., y Okumura, M. Histopathology of the heart and muscles in mice immunized against *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop, São Paulo*, 8:151, 1966.
  12. - Golub, E.S., Mishell, R.I., Weigle, W.O., y Dutton, R.W. A modification of the hemolytic plaque assay for use with protein antigens. *J. Immunol.*, 100:133, 1968.
  13. - Jerne, N.K., y Nordin, A.A., Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140:405, 1963.
  14. - Ortiz-Ortiz, L., y Jaroslow, B.N. Enhancement by the adjuvant, endotoxin, of an immune response induced in vitro. *Immunol.*, 19:387, 1970.
  15. - Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C., y Halpern, B.N. Étude quantitative de l'activité granulopexique du système réticuloendothélial chez la souris. *C.R. Soc. Biol., Paris* 148:431, 1954
  16. - Stuart, A.E., En Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir (Ed.), p. 1034, Blackwell, Oxford, 1967.
  17. - Hege, J.S., y Cole, L.J., Antibody plaque-forming cells: Kinetics of primary and secondary responses *J. Immunol.* 96:559, 1966.
  18. - Nowotny, A. Basic Exercises in Immunochemistry, p. 12 Springer-Verlag, New York Inc., 1969.
  19. - Reed, L.S., y Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints.

- Am. J. Hyg. 27:493, 1938.
- 20.- Goble, F.C. En Immunity to Parasitic Animals.  
- G.J. Jackson, R. Herman, y I. Singer (eds),  
p. 655, Appleton-Century Crofts, New York, 1970.
  - 21.- Feldman, M. Unanue, E.R. En Progress in  
Immunology, B. Amos (Ed.), p. 1379, Academic  
Press, New York, 1971.
  - 22.- Mosier, D.E. A requirement for two cell types for  
antibody formation in vitro. Science, 158:1573,  
1967.
  - 23.- Salaman, M.H., Immunosuppressive effects in  
infection. Immunodepression by mammalian viruses  
and plasmodia. Proc. Roy. Soc. Med., 63:11, 1970.
  - 24.- Greenwood, B.M., Playfair, J.H.L., y Torrigiani,  
G. Immunosuppression in murine malaria. Clin. Exp.  
Immunol. , 8:467, 1971.
  - 25.- Greenwood, B.M., Whittle H.C., y Molineux, D.H.,  
Immunosuppression in Gambian trypanosomiasis.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 67:846, 1973.
  - 26.- Urquhart, G.M., Murray, M., Murray, P.K., Jennings,  
F.W., y Bate, E., Immunosuppression in Trypanosoma  
brucei infections in rats and mice. Trans. Roy.  
Soc. Trop. Med. Hyg., 67:528, 1973.
  - 27.- Turk, J.L., Immunological aspects of clinical  
leprosy. Proc. Roy. Soc. Med., 63:1053, 1970
  - 28.- Strickland, G.T., Pettitt, L.E., and Voller, A.,  
Immunodepression in mice infected with Toxoplasma  
gondii. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 22:452, 1973.
  - 29.- Loose, L.D., Cook, J.A., y Di Luzio, N.R.,  
Malarial immunosuppression. A macrophage mediated  
defect. Proc. Helminthol. Soc. (Wash.),  
39:484, 1972.

30. - Garcíã, W., Z. Tropenmed. Parasit., en prensa.
31. - Dias, E. Le Trypanosoma cruzi et ses rapports avec le système réticulo-endothélial, C.R. Soc. Biol., Paris, 110:206, 1932.
32. - Taliaferro, W.H., y Pizzi, T., Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. J. Inf. Dis. 96:199, 1955.
33. - Taratuto, A.L., Yanovsky, J.F., Schmuñis, G.A., Traversa, O.C., González Cappa, S.M., y Parodi, A.S. Histopatology in rockland mice immunized against american trypanosomiasis (Chagas' disease). Am. J. Trop. Med. Hyg., 17: 716, 1968.
34. - Eidinger, D., Salahuddin, A.K., y Millar, K.G., The effect of antigen competition on various manifestations of humoral antibody formation and cellular immunity. J. Exp. Med., 128:1183, 1968.
35. - Uhr, J.W., y Möller, G. Regulatory effects of antibody on the immune response. Adv. Immunol., 8:81, 1968.
36. - Greenbury, C.L., y Moore, D.H., Non-specific antibody-induced suppression of the immune response. Nature (Lond.), 219:526, 1968.
37. - Gellhorn, A., van Dyke, H.B., Pyles, W.J., y Tupikova, N.A. Amyloidosis in hamsters with leishmaniasis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 61:25, 1946.
38. - Chester, T.J., Paucker, K., y Merigan, T.C., Suppression of mouse antibody producing spleen cells by various interferon preparations. Nature (Lond.), 246:92, 1973.

39. - Lindall-Magnusson, P., Leary, P., y Gresser, I.  
Interferon inhibits DNA synthesis induced in  
mouse lymphocyte suspensions by phytohaemagglutinin  
or by allogeneic cells., Nature (New Biology),  
237:120, 1972.
40. - Greenwood, B.M. Autoimmune disease and parasitic  
infections in nigerians. Lancet, ii, 380, 1968.
41. - Allt, G., Evans, EM., Evans, D.H.L., y Targett,  
G.A.T. Effect of infection with trypanosomes on  
the development of experimental allergic neuritis  
in rabbits. Nature (Lond.), 233:197, 1971.

T A B L A I

Determinación de niveles de parásitos en ratones infectados con Trypanosoma cruzi

Días después de la infección <sup>a</sup>	Ratones por Grupo	Parásitos en sangre x 10 <sup>6</sup> /ml (promedio)	% de nidos de amastigotes en el corazón. <sup>b</sup> (promedio) <sup>b</sup>	Peso del corazón ± E.E.	
				mg	p <sup>c</sup>
1	6	.001	0	117.6 ± 5.04	>0.6
4	5	.05	0	115.4 ± 6.09	>0.8
7	6	.13	0	118.2 ± 4.15	>0.5
9	5	1.26	4.25	123.2 ± 3.15	>0.1
11	6	4.62	5.0	131.8 ± 6.52	>0.05
14	6	10.31	17.2	122.2 ± 4.87	>0.2
16	6	11.98	37.1	134.4 ± 7.57	>0.05
18	4	10.85	93.1	152.1 ± 6.79	<0.01
23	4	26.71	24.0	147.3 ± 11.78	<0.05
25	4	14.23	9.3	152.5 ± 12.4	<0.05
Grupo control no infectado	6	0	0	113.3 ± 6.2	---

<sup>a</sup>Ratones CF1 inoculados i.p. con 2x10<sup>4</sup> tripomastigotes de T. cruzi

<sup>b</sup>Secciones de corazón de ratones infectados fueron examinadas para investigar nidos de amastigotes de T. cruzi. El porcentaje de nidos de amastigotes fué calculado de los datos obtenidos después de contar 1,200 campos microscópicos.

<sup>c</sup>El valor de p fué calculado por comparación de los grupos de ratones infectados y controles por la prueba t de Student.

T A B L A II

Eliminación de carbón coloidal de la circulación sanguínea de ratones normales y de ratones infectados con T. cruzi

Densidad óptica (D.O.) de sangre 3 minutos después de la inyección de carbón coloidal + E.E. <sup>a</sup>				
Días después de la infección	No-infectados (NI)	Infectados (I)	Porcentaje diferencia NI vs. I	p <sup>b</sup>
1	0.66 ± 0.05	0.57 ± 0.06	14	>0.2
5	0.47 ± 0.03	0.33 ± 0.01	30	<0.01
7	0.59 ± 0.02	0.36 ± 0.05	39	<0.01
14	0.63 ± 0.01	0.20 ± 0.03	68	<0.001
18	0.54 ± 0.04	0.29 ± 0.03	46	<0.001
23	0.45 ± 0.04	0.25 ± 0.03	44	<0.01

<sup>a</sup>Ratones con peso aproximado de 25 g fueron inoculados i.v. con 0.25 ml de una suspensión de carbón coloidal que contenía 55 mg/ml pH 7.35-7.4. La cantidad de carbón que permaneció después de 3 minutos fué calculada espectrofotométricamente. Una D.O. más pequeña indica que permanece menos carbón en circulación y que la actividad fagocítica está aumentada. Promedio de 5 animales/día ± error estandar.

<sup>b</sup>El valor de p fué calculado por la prueba t de Student.

T A B L A III

Efecto de la infección experimental en ratones con Trypanosoma cruzi sobre la respuesta de células formadoras de anticuerpos 19S (CFAD) contra eritrocitos de burro (E B)

Días después de la infección <sup>a</sup>	Promedio de CFAD x 10 <sup>6</sup> células viables <sup>b</sup>		
	Log ± E.E.	Geométrico	p <sup>c</sup>
1	2.49 ± 0.03	310	> .6
4	2.62 ± 0.09	417	> .6
7	2.12 ± 0.16	132	> .05
9	2.20 ± 0.19	166	> .1
11	1.35 ± 0.28	22.4	< .01
14	2.01 ± 0.12	103	< .02
16	1.25 ± 0.35	17.8	< .02
18	1.29 ± 0.10	19.5	< .001
23	1.18 ± 0.17	15.2	< .01
25	0.79 ± 0.31	6.1	< .01
Grupo control no infectado	2.54 ± 0.12	347	---

<sup>a</sup>Ratones CF1 inoculados i.p. el día 0 con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes.

<sup>b</sup>Los ratones infectados fueron inmunizados con EB a diferentes intervalos, antes ó después de la infección con T. cruzi. Los animales fueron sacrificados 4 días después de la inmunización y se determinó el número de CFAD. Promedio de 5 ratones ± error estandar.

<sup>c</sup>El valor de p fué determinado por la prueba t de Student por comparación del grupo infectado con el grupo control no infectado.

T A B L A IV

Efecto de la infección experimental en ratones con Trypanosoma cruzi sobre la respuesta de células formadoras de anticuerpos 7S (CFAI) a eritrocitos de burro (EB)

Días después de la infección <sup>a</sup>	Promedio de CFAI x 10 <sup>6</sup> células viables <sup>b</sup>		
	Log $\pm$ E.E.	Geométrico	p <sup>c</sup>
1	2.44 $\pm$ 0.08	276	>0.8
5	2.33 $\pm$ 0.21	215	>0.4
8	2.34 $\pm$ 0.22	220	>0.7
12	2.28 $\pm$ 0.07	191	>0.2
15	1.66 $\pm$ 0.27	46	<0.05
19	1.76 $\pm$ 0.18	58	<0.01
22	1.50 $\pm$ 0.05	32	<0.001
Grupo control no infectado	2.41 $\pm$ 0.07	258	---

<sup>a</sup>Ratones CF1 inoculados i.p. el día 0 con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes

<sup>b</sup>Los animales fueron sacrificados 10 días después de la inmunización con EB y se determinó el número de CFAI en células de bazo. Promedio de 5 ratones por grupo.

<sup>c</sup>El valor de p se determinó por comparación entre los grupos infectados y el grupo control, por la prueba  $t$  de Student.

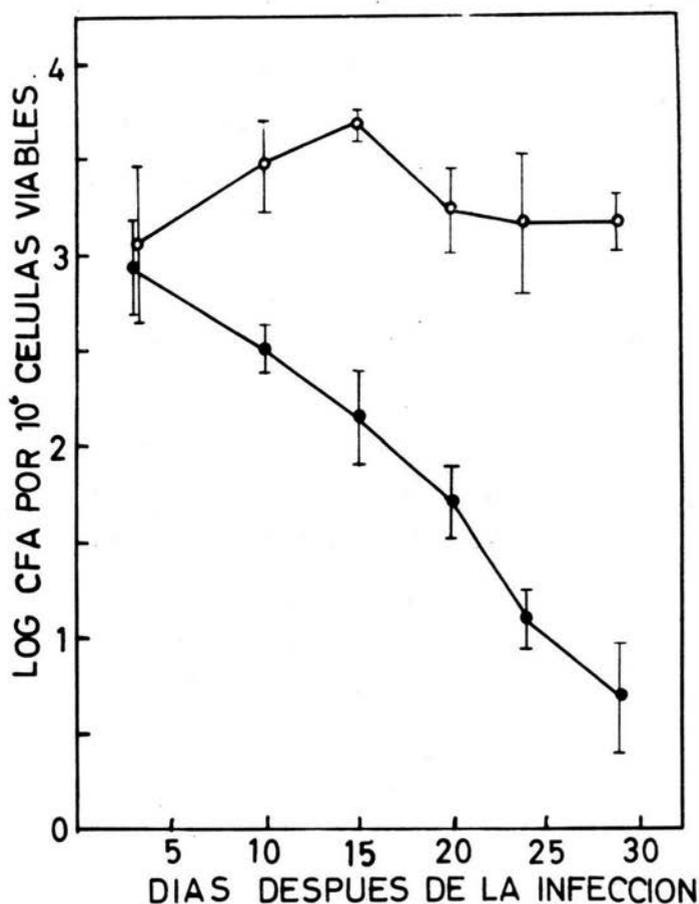


Fig. 1. Efecto de la infección en ratones, con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes de *T. cruzi* sobre la producción de células formadoras de anticuerpos 7S (CFAI) en la respuesta secundaria contra eritrocitos de burro --- ( $1 \times 10^9$  células/ml) administrados por vía i.p. antes o después de la infección. Los animales controles no infectados (○—○) que recibieron el segundo estímulo del antígeno eritrocítico desarrollaron una respuesta uniforme de CFAI durante el experimento. Sin embargo, los animales infectados que también fueron reestimulados con EB (●—●) exhibieron una supresión significativa ( $P < 0.01$ ) en la respuesta de CFAI después de 10 días de infección. Esta inmunosupresión continuó aumentado durante todo el experimento a nivel significativo ( $P < 0.001$ ). Cada punto representa el promedio de 5 animales  $\pm$  error estandar.

LOG TITULO (50% UNIDADES DE HEMOLISIS / ML. SUERO)

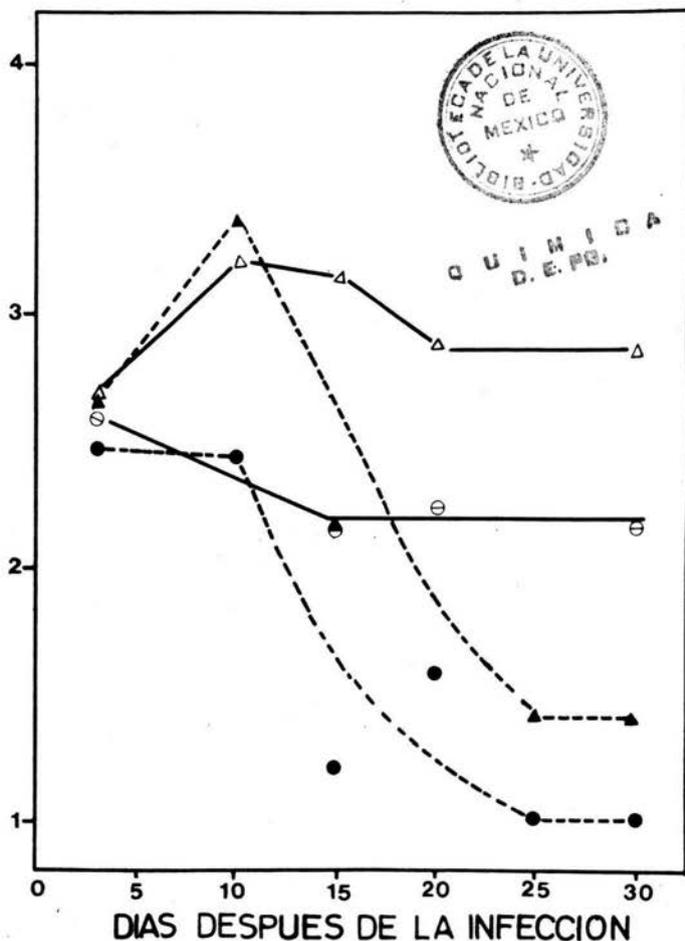


Fig. 2. Efecto de la infección en ratones con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes de *T. cruzi* sobre la respuesta de anticuerpos circulantes (totales y hemolisinas 7S) a la reinyección de  $1 \times 10^9$  EB administrados por vía i.p. antes o después de la infección. Ratones controles que recibieron el 2o. estímulo de EB y no fueron infectados con el parásito, mostraron durante todo el experimento una variación menor tanto en la cantidad de anticuerpos totales (Δ—Δ) como en la cantidad de anticuerpos resistentes a 2-mercaptoetanol (7S) (⊖—⊖). En cambio, los sueros de la animales infectados con *T. cruzi* mostraron una inmunosupresión después de 15 días de infección tanto en los títulos de anticuerpos totales (▲---▲) como de anticuerpos 7S (●---●). Cada punto representa el promedio de un grupo de sueros obtenidos de 5 animales y realizado por duplicado.