

Tesis de Posgrado

Tripanosoma cruzi : regulación de la respuesta inmune durante la infección en un modelo experimental murino

Rottenberg, Martín Enrique

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rottenberg, Martín Enrique. (1988). Tripanosoma cruzi : regulación de la respuesta inmune durante la infección en un modelo experimental murino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2188_Rottenberg.pdf

Cita tipo Chicago:

Rottenberg, Martín Enrique. "Tripanosoma cruzi : regulación de la respuesta inmune durante la infección en un modelo experimental murino". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2188_Rottenberg.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Trypanosoma cruzi: regulación de
la respuesta inmune durante la infección
en un modelo experimental murino

Autor: Licenciado Martín Enrique Rottenberg

Directora: Doctora Elsa Leonor Segura

Trabajo realizado en el
Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de
la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén",
Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación

Tesis presentada ante la
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
de la Universidad de Buenos Aires
para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1988

2.183
Ej 2.

INDICE

0: RESUMEN.....	6
1: INTRODUCCION: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO	
1.1: Epidemiología.....	9
1.2: Agente etiológico.....	11
1.3: Ciclo de vida del parasito.....	12
1.4: Mecanismos o vías de infección	15
1.5: Curso de la infección y patología.....	16
1.5.1: Enfermedad aguda.....	16
1.5.2: Forma latente o indeterminada.....	18
1.5.3: Enfermedad crónica.....	18
1.6: Respuesta inmune en la infección con <u>Trypanosoma cruzi</u>	21
1.7: Respuesta inmune asociada a la resistencia.....	23
1.7.1: Estudios en animales con respuesta inmune deficiente.....	23
1.7.2: Transferencia pasiva de resistencia.....	24
1.7.3: Estudios en animales inmunosuprimidos.....	25
1.8: Alteraciones de la respuesta inmune celular durante la infección con <u>Trypanosoma cruzi</u>	27
1.8.1: Activación policlonal.....	27
1.8.2: Inmunodepresión durante la fase aguda de infección con <u>Trypanosoma cruzi</u>	31

1.8.3: Características del sistema interleuquina 2 y alteraciones del mismo durante la infección con <u>Trypanosoma cruzi</u>	33
1.8.4: Alteraciones de la respuesta inmune durante la fase crónica de infección	37
1.9: Papel de células fagocíticas mononucleares en la resistencia a la infección con <u>Trypanosoma cruzi</u>	39
1.10: Papel de interferón gama y otras linfoquinas en la resistencia a la infección con <u>Trypanosoma cruzi</u>	41
1.11: Respuesta inmune humoral y papel de los anticuerpos en la resistencia a la infección	44
2: OBJETIVOS.....	50
3: MATERIALES Y METODOS	
3.1: Parasitos.....	51
3.2: Animales	51
3.3: Antígenos de <u>Trypanosoma cruzi</u>	52
3.4: Esquemas de inmunización.....	53
3.5: Infección experimental	53
3.6: Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	53
3.7: Ensayo de inmunofluorescencia indirecta	55
3.8: Pruebas de hipersensibilidad retardada	56
3.9: Obtención de células de bazo y ganglio	56
3.10: Transferencia pasiva de células linfoides o suero inmune ..	57
3.11: Ensayo de linfoproliferación	57
3.12: Separación de células adherentes por pasaje en columna de Sephadex G-10.....	58
3.13: Separación de células adherentes a lana de nylon	59
3.14: Separación de células con receptor Fc de superficie por el	

método de Panning (adsorción)	60
3.15: Deplecion de subpoblaciones celulares por tratamiento con anticuerpo contra distintos marcadores de superficie y complemento	61
3.16: Administración de anticuerpos contra subpoblaciones linfocitarias <i>in vivo</i>	62
3.17: Ensayo de células formadoras de placas	62
3.18: Ensayo de actividad natural killer (NK)	63
3.19: Estimulación <i>in vitro</i> para la producción de interleuquina-2	64
3.20: Dosaje de interleuquina-2	65
3.21: Ensayo de unión utilizando interleuquina-2 marcada radioactivamente	65
3.22: Análisis de Scatchard de receptor de IL-2 sobre la superficie celular	66
3.23: Preparación de blastos de concanavalina A y ensayo de proliferación de los mismos en respuesta a IL-2	68
3.24: Administración <i>in vivo</i> de linfoquinas	68
3.25: Separación molecular por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	69
3.26: Métodos estadísticos	70

4: RESULTADOS

4.1: Respuesta inmune protectora en animales inoculados con antígenos del parásito

4.1.1: Inmunización de ratones con fracciones subcelulares de Trypanosoma cruzi71

4.1.2: Respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con antígenos del parásito72

4.1.3: Respuesta inmune celular en animales inmunizados con antígenos de T.cruzi antes y después del desafío con el parásito72

4.1.4: Transferencia de resistencia a la infección por Trypanosoma cruzi con células linfoides o suero de animales inmunizados con FBP o crónicamente infectados76

4.2: Papel de distintas subpoblaciones celulares linfoides en la resistencia natural a la infección experimental con Trypanosoma cruzi

4.2.1: Depleción de subpoblaciones celulares linfoides por tratamiento *in vivo* de ratones con diferentes anticuerpos contra marcadores de las mismas77

4.2.2: Resistencia a la infección con Trypanosoma cruzi en ratones deplecionados de células T, T colaboradoras y NK78

4.2.3: Producción de anticuerpos anti Trypanosoma cruzi en animales deplecionados de células T colaboradoras por tratamiento *in vivo* con anti L3T479

4.3: Modulación de la producción y respuesta a linfoquinas y factores solubles durante la infección experimental con <u>Trypanosoma cruzi</u> y análisis de estos factores en el marco de la resistencia a la infección experimental con el parásito	
4.3.1: Producción de IL-2 y expresión de su receptor durante la fase de activación policlonal inducida por la infección con <u>Trypanosoma cruzi</u>	80
4.3.2: Modulación del sistema IL-2 durante la etapa tardía de la fase aguda de la infección con <u>Trypanosoma cruzi</u>	82
4.3.3: Células de bazo de animales infectados con <u>Trypanosoma cruzi</u> producen factores solubles que inhiben la proliferación celular	85
4.3.4: Administración in vivo de interleuquina 1, interleuquina 2, interferon τ e interferon α - β en la resistencia a la infección con <u>Trypanosoma cruzi</u>	87
4.3.5: Relación entre la inmunodepresión y la actividad de prostaglandinas	88
5: FIGURAS Y TABLAS	90
6: DISCUSION	148
7: CONCLUSIONES	179
8: BIBLIOGRAFIA	182
8: ABREVIATURAS	212
9: AGRADECIMIENTOS	213

O. RESUMEN:

Se estudió la respuesta inmune humoral y celular en ratones inmunizados con la fracción flagelar (F), F adyuvada con Bordetella pertussis (F-Bp) y microsomal (Mc) de epimastigotes de Trypanosoma cruzi. La respuesta inmune se estudió antes y después del desafío con 50 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen. La inmunización con F-Bp, pero no con F, Mc o Bp protegió a los ratones del desafío con el parásito en términos de parasitemia y mortalidad. Antes del desafío los ratones inmunizados con FBp presentaban mayor título de anticuerpos específicos que los inmunizados con F o Mc. Los niveles de anticuerpos 17 dpi fueron similares en los tres grupos, mientras que los animales no inmunizados mostraron niveles menores. Durante la infección temprana los animales no inmunizados no presentaron respuesta de hipersensibilidad retardada a antígenos del parásito ni respuesta proliferativa a ConA. Sin embargo, ratones inmunizados con F-Bp mostraron ambas respuestas antes y después del desafío con T.cruzi. La reacción cutánea es transferida por células de bazo de ratones inmunizados con FBp. Los ratones inmunizados con Mc tuvieron la misma reactividad celular específica e inespecífica que los infectados no inmunizados. Además la transferencia pasiva de células linfoides de ratones inmunizados con FBp pero no con F, confirió protección parcial al desafío con 50 parásitos Tulahuen.

Por otro lado la transferencia de suero de animales inmunizados con F o FBp no protegió a los ratones del desafío con T.cruzi. Sin embargo los receptores de animales crónicamente infectados resultaron protegidos por la transferencia de suero o

de células linfoides. La depleción de células B o adherentes del bazo de los crónicamente infectados no eliminó la capacidad de conferir protección. La depleción de distintas subpoblaciones de células T, tampoco eliminó la capacidad de transferir resistencia a la infección. Los resultados muestran diferencias entre la respuesta inmune humoral y celular animales protegidos y no protegidos, así como la presencia de diferentes mecanismos protectivos en animales inmunizados y en los crónicamente infectados.

Posteriormente se realizaron experiencias con el objeto de evaluar el papel de diferentes poblaciones linfocitarias en la resistencia a la infección con T.cruzi. Se inyectaron ratones BALB/c y C57B1/6 con anticuerpos monoclonales contra el determinante pan T, Thy1.2; contra el determinante L3T4 de células T inductoras o colaboradoras, contra un determinante alotípico presente en la superficie de células NK de C57B1/6, NK1.1; o con un antisuero policlonal de conejo contra células NK (anti asialo GM-1). El efecto de estos tratamientos in vivo fue confirmado en ensayos funcionales.

Los ratones deplecionados de células T, T colaboradoras o NK presentaron mayor susceptibilidad a la infección que los respectivos controles.

Además el tratamiento con anti L3T4 inhibió la formación de anticuerpos anti T.cruzi en los animales inmunizados con antígenos del parásito, es decir que la producción de anticuerpos anti T.cruzi es dependiente de células T colaboradoras. El tratamiento con interferón alfa beta, que estimula la actividad NK, aumenta la resistencia a la infección de los ratones tratados, lo que apoya

el papel de células NK en la resistencia. Este efecto se logró por la administración de 2500 unidades un día antes, al día y un día después de la infección con 50 parasitos Tulahuén.

Demostramos la presencia de células T Lyt1.2 positivas que durante la infección temprana producen IL-2, en forma dependiente de la dosis infectiva y sin el agregado de mitógenos o antígenos al medio de cultivo. La presencia de células productoras de IL-2 tuvo lugar con la misma cinética que una fuerte actividad proliferativa "espontanea". Se detectó la expresión del receptor de IL-2 en el mismo periodo sobre la superficie de células T, Lyt2.2 negativas. Una notable disminución de la producción de IL-2 y la proliferación celular en respuesta a ConA fue observada entre la segunda y la cuarta semana post-infección. Demostramos que también la expresión de los receptores de IL-2 de alta y baja afinidad se encuentran deprimidas. Esta alterada expresión se confirmó en ensayos funcionales y no se debe a una alteración en la frecuencia de diferentes subpoblaciones linfocitarias, y puede explicar la incapacidad de respuesta de células a ConA aun en presencia de la linfoquina. Se observó que la administración de IL-2 recombinante *in vivo*, en diferentes vías, y cepas de ratones, adyuvada o no, no condujo a un aumento de resistencia en los animales tratados. La administración de rec-IL-1 tampoco disminuyó la susceptibilidad de los ratones. En contraste con estos datos, la administración de interferón gama recombinante resultó en un descenso de la parasitemia y la mortalidad de los animales tratados. Este efecto es dosis dependiente, y se pudo reproducir por la administración de una sola dosis 24 horas antes de la infección.

Se ha demostrado además que células de bazo de animales infectados al 21 pi producen factor(es) solubles que inhiben la proliferación celular. Estos factores inhiben la proliferación de diferentes líneas celulares y presentan un peso molecular de 50 y 150 kD. Su producción no depende de la actividad de los productos de la vía de la ciclooxigenasa del ácido araquidónico.

La presencia de indometacina en el cultivo tampoco tuvo efecto sobre la respuesta a ConA de células de bazo de ratones al 21 dpi.

1. INTRODUCCION: ANTECEDENTES DEL PRESENTE ESTUDIO.

1.1: EPIDEMIOLOGIA

La infección de seres humanos por el Trypanosoma cruzi provoca la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Esta patología constituye en Centro y Sudamerica un serio problema medico-social.

Se ha estimado que un 10 % de la población del area (48), abarca desde el sur de EEUU (67) hasta el paralelo 42 de latitud sur esta infectada, constituyendo una cifra varias veces millonaria.

Distintas evaluaciones de la prevalencia de infección realizadas en nuestro país en los últimos años mostraron una disminución del porcentaje de infectados en relación con la actividad de campañas de control del vector(230). Los estudios realizados mostraron que la prevalencia aumenta con la edad, indicando un perfil de transmisión activa y que los porcentajes de infección dependen de las condiciones socio económicas de los habitantes (19). Este perfil esta vinculado a la precariedad de las viviendas y a la adaptación de algunos insectos vectores del parasito al ambiente domiciliario y peridomiciliario.

1.2: AGENTE ETIOLOGICO

El agente causal fue descrito por Carlos Chagas en 1909 en el intestino medio de un insecto hematófago, el Pastrongilus megistus, que infectaba chozas del estado de Minas Geraes en Brasil (49). Chagas lo denominó Trypanosoma cruzi.

El mismo Chagas logró posteriormente transmitir el parásito a un mono por picadura con dichos insectos, y por inoculación a otros animales del laboratorio; finalmente lo encontró en la sangre de una niña (50).

Así antes de conocerse las características de la enfermedad se había descrito el agente causal y la forma de transmisión, que para Carlos Chagas era por picadura; posteriormente se demostró que el parásito se encontraba en las heces y no en la saliva del insecto vector. En la década del 40 ampliaron la caracterización de la enfermedad los médicos argentinos Salvador Mazza y Cecilio Romaña.

Siguiendo a Hoare (93), la ubicación taxonómica del parásito es la siguiente:

Filum: PROTOZOA

Subfilum: SARCOMASTIGOPHORA

Clase: MASTIGOPHORA

Orden: TRICOMASTIGOPHORA

Suborden: KINETOPLASTIDA

Suborden: TRYPANOSOMATINA

Familia: TRYPANOSOMATIDAE

Genero: TRYPANOSOMA

Subgenero: SCHIZOTRYPANOSOMA

Especie: CRUZI

Se trata de un parásito unicelular, eucariote, que como medio de locomoción utiliza un flagelo. El flagelo esta formado por un axonema central y una vaina externa continuación de la membrana celular. El axonema esta constituido por 9 pares de microtúbulos periféricos y dos centrales, rodeados por una vaina interna. El flagelo puede introducirse en el citoplasma celular, formando entonces la membrana ondulante. En el citoplasma existe una estructura denominada cuerpo basal, blefaroplasto o cinetosoma, que es el lugar de donde parte el axonema. Cerca del cinetosoma se encuentra el cinetoplasto, a veces tan próximos que al microscopio óptico se ven como un solo cuerpo. Formado por una doble membrana que encierra ADN en su interior, es parte de la mitocondria del parásito. Rodeando el cuerpo celular, debajo de la membrana celular, existe un sistema de microtúbulos que le confiere resistencia al parásito. Poseen ademas reticulo endoplasmático rugoso bien desarrollado y el aparato de Golgi entre el nucleo y el cinetosoma.

1.3: CICLO DE VIDA DEL PARASITO

Parece existir suficiente evidencia para aceptar que el T.cruzi es diploide pero que su reproducción es basicamente clonal, con muy poco o nada de recombinación genética (257-258-259). El T.cruzi es un protozoo parásito digenético. En su ciclo de vida es endoparásito obligado, y huesped alternado de insectos y mamíferos. En ambas etapas, la especificidad de huesped es muy baja, parasitando gran número de insectos de la familia

Reduviidae (93) (géneros *Triatoma*, *Rhodnius*, *Pastrongilus*, etc), así como especies de mamíferos pertenecientes a por lo menos ocho ordenes diferentes, que constituyen reservorios de importancia en la epidemiología de la enfermedad, ya que los tripomastigotes sanguíneos presentes en el huésped vertebrado constituyen la fuente de infección de los triatomíneos (15,79).

En su ciclo de vida el T.cruzi presenta distintos estadios fisiológica y morfológicamente distinguibles, caracterizados según el flagelo (su nacimiento junto al cinetoplasto, curso intracelular y punto donde emerge libre del citoplasma) y la posición relativa del cinetoplasto respecto del núcleo celular (Figura 1). En la luz del tracto intestinal del insecto los parásitos se multiplican extracelularmente como epimastigotes (flagelo emergente desde la región anterior, núcleo central y cinetoplasto anterior al mismo) y se transforman en tripomastigotes metacíclicos (flagelo emergente en la extremidad anterior, núcleo central y cinetoplasto posterior al mismo, y membrana ondulante), que se acumulan en la ampolla rectal y son excretados con las heces. Los reduvidos vectores defecan durante e inmediatamente después de la alimentación, por lo que los tripomastigotes son excretados en el entorno del área picada por el insecto; este hecho y la respuesta refleja de rascarse después de la picadura favorecen la invasión del huésped mamífero.

Los tripomastigotes atraviesan la piel dañada en la zona de la picadura, penetran luego en las células del tejido próximas al sitio de inoculación, y se transforman en amastigotes (de menor tamaño, redondeado, con cinetoplasto del que surge una estructura intracelular similar a un flagelo) que se multiplican por fisión

binaria. El tiempo de duplicación es variable y depende de las características genéticas del parásito (66). Luego de un número de divisiones también determinado por la información genética del parásito, (66) los parásitos se diferencian a tripomastigotes, y la célula termina por romperse liberándose los parásitos, que pueden observarse en la sangre.

Los tripomastigotes circulan en el torrente sanguíneo y, con él, pueden alcanzar cualquier parte del organismo e invadir otras células, fundamentalmente las fibras musculares lisas, estriadas o cardíacas (241), o las células del sistema retículo endotelial. Pueden también parasitar células gliales (251) aunque no lo harían en fibras nerviosas.

La aparente predilección por algunos de estos tipos celulares hizo clasificar a los parásitos de distintas cepas en mio o reticulotrópicos, pero la base de este tropismo es desconocida y no siempre hay acuerdo entre los resultados *in vivo* e *in vitro* (145). Más aun hay antecedentes de que la selectividad podría cambiar durante el curso de la infección.

Los tripomastigotes circulantes son los responsables de cerrar el ciclo de transmisión, ya que son las formas que tomará otro insecto cuando se alimente con la sangre del mamífero infectado.

Las distintas formas del parásito son cultivables *in vitro* en medios axénicos: desde hace muchos años para los epimastigotes (43), y más recientemente, para tripomastigotes y amastigotes .

1.4: MECANISMOS O VIAS DE INFECCION

La principal forma de transmisión de la enfermedad es la contaminativa, a través de heces de vinchucas. Esta forma seguirá siendo la predominante hasta que se logre el control de los triatomos domiciliarios y peridomiciliarios.

Otra forma de transmisión es la transfusional, que ocurre cuando se introducen parásitos pasivamente en pacientes transfundidos con sangre infectada con T.cruzi. Se estima que la prevalencia de dadores de sangre con serología positiva para Chagas es del 5% (36). El control en bancos de sangre, actualmente en ejecución, disminuye los riesgos de contaminación por esta vía.

La vía de infección transplacentaria es responsable de aborto, prematuridad o infección congénita de hijos de madres chagásicas. Distintos estudios epidemiológicos demostraron seropositividad para el T.cruzi que varió entre el 4.4 y el 52.2% de las mujeres gestantes de zonas no endémicas y endémicas respectivamente, mientras que las cifras de prevalencia de infección congénita fueron mucho más bajas (156). La incidencia de este tipo de transmisión varía según el grado de endemicidad de las zonas estudiadas: 2.3% de los niños nacidos de madres infectadas en Córdoba (219) y 0.5% (14) en la provincia de Buenos Aires.

El parásito circulante en la sangre materna, puede infectar el trofoblasto y el estroma de las vellosidades placentarias, desde donde puede luego infectar la sangre fetal. De todos modos los porcentajes de individuos infectados por transfusión, pasaje transplacentario o accidentes de laboratorio es bajo con respecto a los infectados por transmisión vectorial.

1.5: CURSO DE LA INFECCION Y PATOLOGIA

Tanto en el humano como en animales de laboratorio se pueden describir tres formas de presentación de la Enfermedad de Chagas: la enfermedad aguda, una forma latente o indeterminada, y la enfermedad crónica.

Estas formas pueden ser consideradas como diferentes fases de la enfermedad, aunque no todas se presentan en individuos infectados por T.cruzi. Las diferentes formas han sido descritas en detalle (125,194) por lo que serán consideradas solo someramente en este estudio.

1.5.1: ENFERMEDAD AGUDA

En el sitio de entrada del parásito hay una reacción inicial característica llamada comunmente chagoma. Es una reacción nodular de la piel, dura, roja y caliente, con edema intersticial marcado. Se prolonga por 2 o 3 semanas después de la picadura.

El chagoma puede localizarse en cualquier parte del cuerpo. Cuando el lugar de entrada es la conjuntiva hay un edema de párpado llamado signo de Romaña. Las lesiones histopatológicas se caracterizan por un infiltrado de células inflamatorias (predominantemente mononucleares) y parasitismo intracelular de los macrófagos tisulares.

Puede haber adenopatías satélites, los ganglios linfáticos de drenaje desarrollan hiperplasia reactiva no específica.

Hay una respuesta febril que se asocia con dolor muscular y oseo, escalofríos y anomalías cardíacas de grado variable.

Hay proliferación intracelular de amastigotes, y la parasitemia es generalmente elevada.

En un alto porcentaje de los casos hay compromiso cardíaco (0 a 100% de los casos presentan miocarditis o pancarditis aguda) y en menor porcentaje (30%) compromiso neurológico que puede llegar a la meningoencefalitis.

Alrededor de las células parasitadas ocurren reacciones inflamatorias, aunque estas también ocurren en áreas aparentemente libres de parásitos. En otras áreas se encuentran células parasitadas sin lesión inflamatoria.

Las lesiones en el corazón y otros órganos pueden ser severas debido a que la ruptura de las células parasitadas produciría la liberación extracelular de antígeno dando lugar a un infiltrado masivo de neutrófilos y eosinófilos (115).

En Argentina, la forma aguda es mas comun y severa en niños menores de cinco años.

Acompañando a la parasitemia hay generalmente linfocitosis periférica asociada con linfadenopatía reactiva y hepatoesplenomegalia, pudiendo aumentar el número de eosinófilos circulantes en las etapas tardías de la fase aguda. Pueden encontrarse lesiones en los plexos autonomos de las vísceras como en el esófago, colon, corazón, y acompañarse de síntomas gastrointestinales. Se ha demostrado la presencia de antígenos del parásito circulantes en las primeras fases del cuadro agudo, aunque no hay evidencias de depósitos de inmunocomplejos en el riñón.

La reacción local en los tejidos disminuye a las 6-8 semanas después de la infección, y se piensa que ocurre como resultado

del incremento de la inmunidad mediada por células y de una mayor eficiencia de la fagocitosis por los macrófagos.

La recurrencia del estado agudo manifiesto nunca ha sido vista en humanos. Estudios experimentales han demostrado que la inoculación de parásitos en animales crónicamente infectados no induce una fase aguda, lo que se conoce como inmunidad concomitante. Solo se consigue una elevación de la parasitemia utilizando inmunosupresores.

1.5.2: FORMA LATENTE O INDETERMINADA :

En esta fase no hay síntomas clínicos de la enfermedad. Puede haber parasitemia. Este periodo puede durar indefinidamente o desarrollar la enfermedad crónica. Nunca se observó la eliminación espontánea total del parásito (3).

1.5.3: ENFERMEDAD CRONICA

La forma crónica de la Enfermedad de Chagas se caracteriza por la aparición de síntomas y signos clínicos de compromiso cardíaco, digestivo y/o neurológico, en pacientes con serología y/o examen parasitológico positivos. El cuadro clínico depende del órgano afectado, siendo la cardiología chagásica la forma de presentación más común en nuestro país (200).

El agente etiológico puede detectarse mediante xenodiagnóstico en el 30 a 54% de los casos de Enfermedad de Chagas crónica. La sensibilidad de esta técnica está relacionada con el número de insectos utilizados en el examen (35). La enfermedad también puede

ser diagnosticada por métodos inmunodiagnósticos en el 95% de los pacientes.

La cardiopatía chagásica crónica es de evolución lenta y progresiva, y se desarrolla varios años después de que ocurriera la infección aguda, aunque se ha descrito también en etapas tempranas de la vida (77). Los individuos poseen anomalías electrocardiográficas como bloqueos auriculo-ventriculares, bloqueos intraventriculares, bradicardia sinusal y extrasístoles ventriculares. La cardiopatía puede ser sintomática o asintomática. Cuando existe insuficiencia cardíaca, el corazón se presenta agrandado, con dilatación de las cuatro cámaras y ocurre congestión sistémica pasiva. La cardiopatía chagásica crónica puede causar la muerte de los individuos afectados en etapas tempranas de la vida, como consecuencia de insuficiencia cardíaca y/o tromboembolismo pulmonar (33,77,193).

El análisis anatomopatológico del corazón muestra un órgano generalmente agrandado, blando con trombosis murales y un aneurisma apical en aproximadamente un 52% de los individuos (8,77). Al examen microscópico, se destacan los infiltrados inflamatorios mononucleares difusos o multifocales, fibrosis y fenómenos de miocitolisis, pudiendo ser detectadas lesiones en distinto estadio de evolución en un mismo individuo. También se pueden encontrar lesiones inflamatorias y /o degenerativas y fibrosis en las estructuras del sistema nervioso autónomo del corazón y del sistema de conducción cardíaco. En autopsias de pacientes con miocardiopatía chagásica, se detectan parásitos en el corazón de solo 30% de los individuos afectados (8).

En la forma digestiva crónica, existe un aumento del diámetro de distintas partes del tubo digestivo, principalmente del esófago y del colon, con alteraciones de la motilidad. Frecuentemente el megaesófago y/o megacolon ocurren concomitantemente con la cardiopatía chagásica. El megaesófago chagásico ocurre mas frecuentemente en la zona central de Brasil, con una prevalencia del 6 al 9% (194). El megacolon también es mas frecuente en Brasil que en otras zonas endémicas.

Frecuentemente se presenta desnutrición y alteración del estado general del paciente con megaesófago y megacolon, como consecuencia de las alteraciones en el tránsito alimentario.

Además del esófago y el colon se ha descrito dilatación e hipotonía de otros segmentos del tracto digestivo (194) y transtornos de absorción intestinal. La anatomía patológica del tracto alimentario de los individuos con megacolon y megaesófago chagásico muestra hipertrofia de las capas musculares con infiltrados inflamatorios y reducción y/o desaparición de los plexos nerviosos mientéricos (115).

1.6: RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

El T.cruzi induce en el huésped mamífero una vigorosa respuesta inmune (23).

Esta respuesta tiene un componente específico, pero además la infección modifica en forma generalizada el aparato inmune siendo las alteraciones producidas cuanti y cualitativamente importantes. Estas alteraciones inespecíficas están afectadas por y a su vez afectan las respuestas específicas al parásito.

La respuesta inmune defiende al huésped contra los efectos deletéreos de la invasión parasitaria, desde los primeros momentos de la infección. Tiene un papel preponderante en el control de la parasitemia con lo cual determina un balance en la relación huésped-parásito que lleva a la cronicidad de la infección. En modelos experimentales es capaz de proteger de las reinfecciones con el parásito (42,99,245), confirmando así la existencia de la llamada inmunidad concomitante. Además no se conocen casos de infección humana donde se repitan naturalmente episodios agudos en el individuo. Sin embargo no debe descartarse la posibilidad de que el nuevo contacto con el parásito aumente el riesgo de desarrollar manifestaciones patológicas.

A pesar del papel defensivo de la respuesta, esta actividad no logra eliminar totalmente al parásito del huésped. Esto puede deberse tanto a un nivel insuficiente de respuesta para eliminar al parásito, como a la presencia de diversos mecanismos de escape, que el parásito ha desarrollado a lo largo de su evolución, y que le permiten sobrevivir en un huésped que constituye un ambiente biológico hostil, en una fase indeterminada o crónica de larga duración. En esta relación huésped-parásito

debemos considerar las componentes genéticas tanto del huésped como del parásito, factores ambientales y de regulación, que determinan la actividad del sistema inmune.

Por otro lado la infección con T.cruzi induce una respuesta inmune dirigida contra antígenos propios y/o del parásito, que estaría vinculada con la patogenia de la enfermedad. Se ha postulado que mecanismos efectores así como componentes celulares podrían actuar en la patogenia así como también en la defensa contra el parásito. En este marco, un nivel insuficiente de respuesta inmune incapaz de eliminar, aunque si controlar la infección por T.cruzi, podría ser adaptativa para el huésped, ya que estaría asociada a una patología menos severa.

De aquí la importancia de la disección de los componentes del sistema inmune, y de los antígenos del parásito en actividades de agresión o defensa. El entendimiento de la modulación de mecanismos inmunológicos en tales papeles, permitirá el desarrollo de métodos de inmunoprotección, ya sea mediante la posibilidad de un desarrollo de inmunización preventiva o la modulación de la respuesta en tratamientos de inmunoterapia.

1.7: RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LA RESISTENCIA.

El papel de la respuesta inmune en la resistencia a la infección ha sido demostrado principalmente a partir de observaciones y experimentos realizados en animales inmunosuprimidos por diferentes tipos de tratamientos, o por selección genética, y por transferencia pasiva de suero y/o células sensibilizadas.

1.7.1: ESTUDIOS EN ANIMALES CON RESPUESTA INMUNE DEFICIENTE.

Los animales genéticamente atímicos (105,113,228), son más susceptibles a la infección con T.cruzi, tal como lo señalan su mayor parasitismo, parasitemia y un menor tiempo de sobrevivencia. El seguimiento de la infección en animales timectomizados (28,218) o tratados con suero antitimocito (196) ha corroborado la importancia de la actividad de células T en la resistencia. Por otro lado estudios en ratones con baja capacidad de respuesta humoral ("Biozzi low responders") (39,112) y ratas genéticamente deficientes en linfocitos B (198), muestran que los anticuerpos circulantes participan activamente en los mecanismos de protección durante la infección aguda. Además, los ratones tratados neonatalmente con anticuerpos anti IgM, y por lo tanto carentes de la respuesta de células B muestran una infección más severa (263), pero la presencia de componentes independientes de anticuerpos con actividad en la resistencia a la infección (264).

1.7.2: TRANSFERENCIA PASIVA DE RESISTENCIA

La transferencia de anticuerpos y/o células de un animal defendido contra el T.cruzi a un animal singénico ha sido ensayada a fin de definir los mecanismos involucrados en la protección. Sin embargo a pesar de lo simple del planteo experimental, y probablemente debido a inconvenientes técnicos, así como al ensayo de diferentes combinaciones de cepas de ratones y de parásitos, los resultados obtenidos discrepan en cuanto a la identificación de los componentes del sistema que actúan en la defensa a la infección.

Los experimentos de transferencia pasiva de anticuerpos han dado resultados no confluyentes: mientras algunos investigadores lograron proteger animales por esta vía (100, 105, 118, 143, 144, 247, 270), otros no lo han logrado (40, 187) o han encontrado que la transferencia de protección requiere el empleo de parásitos de la misma cepa en las dos etapas (100) (la inmunización o infección del donante y el desafío del animal recipiente), o bien que la protección depende de la antigüedad de la infección.

Diversos grupos han logrado conferir resistencia a la infección por transferencia de células, salvo datos aislados en contrario. Sin embargo, existe variación entre los distintos autores en cuanto a la población de células responsables de esta protección, asignando algunos esta capacidad a las células B (211, 267) y otros a las células T (28, 170, 187, 205). Si las células T actúan cooperando en la producción de anticuerpos tales divergencias se compatibilizarían en parte. Las diferencias

en los modelos experimentales utilizados también podrían explicar tales divergencias.

La transferencia de células T en animales C3H tratados con anti IgM neonatalmente mostró la existencia de mecanismos efectores de resistencia independientes de la presencia de anticuerpo (264). Recientemente Nickell y col (165), mostraron la posibilidad de transferir resistencia por líneas y clones de células T, Lyt 1,2 positivas. Los antígenos del parásito reconocidos por estos clones T podrían ser inductores o blancos de una respuesta protectora.

1.7.3: ESTUDIOS EN ANIMALES INMUNOSUPRIMIDOS

La importancia de la respuesta inmune en la resistencia a la infección también puede evaluarse por la respuesta a la terapia inmunosupresora.

Las observaciones hechas en animales experimentalmente infectados o pacientes chagasicos tratados con drogas inmunodepresoras muestran resultados contradictorios.

Asi por ejemplo los ratones tratados con cortisona o ciclofosfamida (121) durante la fase aguda hicieron infecciones mas graves. La administración de ciclosporina A también resultó en parasitemias mayores y mas tempranas que las de los ratones controles (109, 142). En animales cronicamente infectados con la cepa CL el tratamiento con ciclofosfamida, o la irradiación resultaron en la aparición de una fase aguda, con elevadas parasitemias y alta frecuencia de mortalidad. Estos resultados no fueron observados en ratones infectados con las cepas Y o

Berenice, en donde tratamientos similares no tuvieron efecto alguno (25).

La administración de ciclosporina A en perros crónicamente infectados con T.cruzi después del trasplante cardíaco, resultó en una reactivación de la infección (21).

El tratamiento de animales crónicamente infectados con imurán o mercaptopurina no alteró el curso de la infección crónica (25).

En pacientes chagásicos crónicos, los resultados no son concordantes. En algunos casos los tratamientos no produjeron alteraciones en la infección parasitaria ni signos histológicos de reactivación (12,13), en otros casos y con tratamientos semejantes se reagudizó la infección chagásica (7,116). En varios casos se llegó a la encefalitis aguda sin cardiopatía y los datos histológicos mostraron severos compromisos infecciosos.

La interpretación de estas observaciones, aparentemente discordantes, sobre la reagudización de la forma crónica de la enfermedad no es sencilla, básicamente debido a la falta de conocimiento sobre la modulación de la respuesta inmune en los tratamientos efectuados.

1.8: ALTERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR DURANTE LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI.

La infeccción por T.cruzi induce importantes alteraciones en el sistema inmune del huesped mamífero. La cinética y magnitud de dichas alteraciones sugieren mecanismos que son, muy probablemente, independientes del reconocimiento de determinantes antigénicos específicos del parásito.

Es posible identificar dos fenómenos que operan en la fase aguda de infección con estas características: una etapa temprana de activación policlonal de células B y T, seguida por una fase de inmunodepresión, probablemente consecuencia de aquella. Estas etapas son comunes a diversas infecciones bacterianas (70) y virales (201), así como en algunos modelos de infecciones parasitarias. Es necesario destacar que no se conoce el valor biológico de estas alteraciones en el contexto de la Enfermedad de Chagas, aunque se ha postulado que los eventos de la fase aguda de la infección determinan la evolución de la fase crónica de la misma (tesis doctoral J.C.Pinto Dias).

1.8.1: ACTIVACION POLICLONAL :

Ortiz-Ortiz y colaboradores (174) demostraron que la infección con T.cruzi activa policlionalmente las células B, midiendo células productoras de anticuerpos contra antígenos como TNP, eritrocitos de carnero o caballo, γ -globulina humana y aun contra células singeneicas. En trabajos posteriores se observó la presencia de la activación policlonal de células B en ratones

geneticamente atímicos (60), a pesar que es cualitativamente distinta a la que se observa en animales eutímicos. La depleción de células T colaboradoras demostró el papel de dichas células en la activación (149). La activación policlonal se observa sobre todo en células B secretoras de anticuerpos IgG 1,2a y 2b (en especial IgG 2a) representando aproximadamente el 90 % de las células formadoras de placas. Esta activación, que toma máximos niveles en los primeros días de la infección se puede reproducir, aunque en forma parcial utilizando parásitos muertos, lo que sugiere la presencia de un componente mitogénico. Este fenómeno no depende de la dosis de parásitos.

En la fase crónica de la infección también se ha observado la existencia de dicha activación (59).

Recientemente se ha descrito la presencia de números elevados de células T activadas midiéndose un incremento de blastos en proliferación (148), así como células T diferenciadas capaces de ejercer funciones efectoras tanto en la colaboración para la síntesis de anticuerpos (149) o citotoxicidad (147).

No están claros los fenómenos que ocurren en el huésped infectado debido a la activación policlonal, pero esta podría ser un factor importante en la génesis de reacciones autoinmunes que ocurren en la fase crónica de la enfermedad, en la que ha sido descrita la presencia de autoanticuerpos y de células autoreactivas.

Los fenómenos de autoinmunidad local (órgano específica) o generalizada (74) han sido asociadas con la activación policlonal *in vivo*, y relacionados con la persistencia de células de memoria que reconocen estructuras propias.

Se han descrito otros fenómenos que podrían estar asociados a la activación policlonal observada:

1) Hatcher (77,78) ha descrito la inducción de actividad de destrucción de células transformadas, denominada actividad NK ("natural killer") en células de bazo y de peritoneo, que se detecta un día después de la infección y vuelve a valores normales 3 días más tarde. Su función tanto en la resistencia a la infección como en la modulación de la respuesta no son claras, aunque estas células parecen tener un papel en la resistencia a la infección. El tratamiento con inductores de interferón (tilorone) disminuye la susceptibilidad a la infección con el parásito. Los ratones deficientes en la actividad NK (mutación beige) no fueron sensibles al tratamiento con tilorone (98), a pesar que animales con la mutación beige no eran más susceptibles a la infección con T.cruzi que los congénicos heterocigotas. Posteriormente se demostró que células NK de animales luego de 48 horas de infección con T.cruzi, o de ratones tratados con inductores de interferón son capaces de destruir a formas triplo o epimastigotes del parásito *in vitro* (5,87).

De cualquier forma no se puede descartar un papel regulador de las células NK en los mecanismos efectores de resistencia contra el parásito.

2) La presencia de interferón alfa beta en el suero de animales infectados se detecta desde el primer día de infección (114,240). Este tipo de interferón tendría influencia en la evolución de la infección, ya que puede activar macrófagos o aumentar la

capacidad de ejercer actividad NK (72), ambos potenciales mecanismos efectores. La administración de este tipo de interferón en ratones resulta en la atenuación de los efectos de la infección (114).

Se deben pues, considerar el papel en la resistencia a la infección de elementos inmunológicos presentes en las etapas tempranas de infección y probablemente intervinientes en la activación policlonal. En este sentido ratones irradiados o genéticamente atímicos muestran un defecto en el control temprano de la proliferación del parásito (266). El control temprano de la infección, que correlaciona con la resistencia a la enfermedad, ha sido también asociado a la actividad de un gen único, que interviene además en la producción de interferón en las etapas tempranas (265). Los animales portadores de una mutación en este gen (BXH-2) tuvieron niveles de parasitemia similares a los ratones genéticamente atímicos (nu/nu), aunque estos ratones pueden responder en forma normal en la formación de anticuerpos específicos contra el parásito. La resistencia al T.cruzi también ha sido asociada a genes dentro y fuera de la región H-2 del MHC del ratón, aunque con resultados menos contundentes (284).

1.8.2: INMUNODEPRESION DURANTE LA FASE AGUDA DE INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

En la fase aguda de la infección, en pacientes (255) y modelos experimentales, se ha descrito una severa inmunodepresión. La cinética de la inmunodepresión coincide con la de la parasitemia. Están deprimidas las respuestas proliferativas a mitógenos B y T (44, 88, 108, 111, 124, 171), antígenos del parásito (108), o antígenos no relacionados, así como la respuesta de hipersensibilidad retardada contra antígenos del parásito (1,204). También están deprimidas las respuestas humorales hacia antígenos del parásito así como hacia antígenos no relacionados (47).

La inmunodepresión depende de la presencia del parásito vivo (27) y no parece relacionada a la presencia de antígenos específicos relacionados como ocurre en infecciones con Trypanosoma congolense, Trypanosoma evansii (285) Leishmania major o Mycobacterium laeprae. Una repetida estimulación antigénica puede sobrellevar la inmunodepresión en la infección experimental con T.cruzi (52).

El estado anérgico ha sido atribuido a la actividad de células T supresoras (184), células adherentes supresoras (18,107), factores supresores solubles (45), alteraciones en el número y las proporciones de subpoblaciones leucocitarias (108), o a defectos en la funcionalidad de las células T (84,124).

Las características de esta depresión dependen de la composición genética del huésped. Diferentes trabajos sugieren una relación de la misma con la resistencia a la infección (16,124) y

que esta componente genética se expresaría fenotípicamente a través de una modulación de los mecanismos inmunológicos de destrucción del parásito.

La deficiencia del huésped infectado para responder a los antígenos del parásito resultaría en una reducción de su capacidad de montar una respuesta inmune protectora. Por lo tanto, la búsqueda de elementos de inmunoprotección por la eliminación de la infección con T.cruzi, deberá considerar la eliminación del estado anérgico, que es inducido aun por números reducidos de parásitos.

Es importante puntualizar que a pesar que se han postulado algunos elementos intervinientes en este estado de inmunosupresión, no se conoce el valor adaptativo de la misma en la relación huésped parásito. Si bien una mayor susceptibilidad al crecimiento de tumores ha sido reportada durante la infección murina (170), la asociación de la infección por T.cruzi con una disminución en la resistencia a tumores o a infecciones oportunistas no es clara, como en el caso de la inmunosupresión inducida por virus de inmunodeficiencia adquirida o en el caso del linfoma de Burkitt producido por el virus de Epstein Barr en individuos infectados con Plasmodium sp. Esto podría deberse a la brevedad del periodo de duración de esta fase de inmunodepresión, que está seguida por una restauración de la respuesta inmune en la fase crónica de infección.

1.8.3: CARACTERISTICAS DEL SISTEMA INTERLEUQUINA 2 Y ALTERACIONES DEL MISMO DURANTE LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

La interleuquina 2 (IL-2), linfoquina producida por células T, L3T4 positivas (colaboradoras) (197), tiene un papel central en la regulación de la respuesta inmune celular (234).

Es sintetizada *de novo* por los linfocitos T específicos luego de la activación por antígeno o mitógeno. Esta síntesis es transitoria.

En el humano la IL-2 es una glicoproteína formada por una sola cadena de 133 aminoácidos (249). A diferencia del interferón no presenta especificidad de especie. La IL-2 se une a la célula por el sitio de unión de una molécula, presente en la membrana y que satisface todos los criterios para considerarla como un receptor hormonal: alta afinidad, saturabilidad, especificidad de células y de tejidos.

Recientemente se ha caracterizado a nivel molecular al receptor celular de IL-2 y se han establecido algunas características de la regulación de su expresión (235,138). La unión de IL-2 a su receptor, presente en células NK, T y B, produce cambios que incluyen la expresión del receptor de transferrina, secreción de factor estimulador de células BSF-1 (redenominado IL-4), e interferón τ , diferenciación y proliferación de células NK, estimulación de la producción de inmunoglobulinas G, y un control sobre el ciclo celular.

La elucidación de la estructura molecular del receptor permitió la comprensión del funcionamiento del sistema. Se han aislado dos proteínas alfa y beta de peso molecular 70 y 55 Kd respectivamente, ambas con capacidad de unir IL-2. La proteína

β une IL-2 con baja afinidad ($K_d 10^{-9}$) la proteína α tiene una afinidad intermedia por el ligando ($K_d 5 \times 10^{-10} - 10^{-9}$ M) (127,239). El receptor de alta afinidad ($K_d : 10^{-11}$) resulta de la interacción cooperativa de ambas cadenas (cada una de ellas capaces de unir al ligando), aunque es la cadena α la responsable de transducir la señal al citoplasma (275), y sería responsable de la activación de células B y NK.

Distintos grupos de investigación han demostrado que la expresión del receptor de IL-2 está regulada por la unión del antígeno o de mitógenos o de la IL-2 a sus receptores celulares (146). La modulación de enzimas ligadas a la activación celular resulta en el aumento de la expresión del receptor de IL-2. La máxima densidad del receptor sobre la membrana es transitoria y coincide con los máximos niveles de proliferación, y depende de la presencia de la linfoquina.

La expresión del receptor se produce por la síntesis *de novo* de la proteína. La activación por antígenos o por el agregado de IL-2 de clones de células T o células de bazo resulta en un aumento de receptores de baja afinidad, pero no hay acuerdo en cuanto a la regulación del receptor de alta afinidad, ni en cuanto a la capacidad de las células de responder a la IL-2. La activación de células T con antígenos o con IL-2 podría volverlas relativamente refractarias a la reestimulación por IL-2 o por antígeno, constituyendo un mecanismo de regulación negativa.

En resumen la activación de células T por antígeno resultaría en una expresión del receptor de IL-2, lo que permitiría a las células proliferar y diferenciarse en presencia de la linfoquina. La expansión clonal a la vez debería estar

limitada. La regulación negativa podría estar dada por la presencia de células supresoras; por la falta de la linfoquina o la desensibilización de los receptores de IL-2 de la célula, que requeriría una mayor concentración de la linfoquina; o por la actividad de IL-1 o interferón τ .

Durante la infección con T.cruzi se produce un bloqueo del componente dependiente de IL-2. En 1983, Harrel-Bellan y col (83), demostraron que la falta de respuesta a la concanavalina A en células de bazo de ratones durante la fase aguda de infección con Trypanosoma cruzi coincide con la falta de capacidad de dichas células de producir o responder a interleuquina 2. Células de bazo no respondían a Con A, ni aun ante el agregado de interleuquina 2 en el cultivo. El agregado de interleuquina 1 (IL-1) en el cultivo tampoco pudo restablecer la producción de interleuquina 2 en respuesta a ConA. La falla en la producción de IL-2 se atribuyó en forma parcial a la presencia de células adherentes, probablemente macrófagos. Sin embargo el agregado de células adherentes obtenidas de animales normales no restauró la capacidad de células T de responder a Con A o producir IL-2. El análisis por dilución límite mostró que la frecuencia de precursores de células respondedoras a IL-2 o productoras de IL-2 está deprimida en la población estudiada. Teniendo en cuenta que las células T de los animales infectados no fueron capaces de suprimir la capacidad de producción o de respuesta de células normales, se postuló que la infección con el parásito induce un defecto en la funcionalidad de la célula T (84).

La falta de producción y de respuesta a IL-2 también ha sido demostrada en un sistema de células humanas infectadas *in vitro*

con T.cruzi (16). La incapacidad de IL-2 para restaurar la respuesta linfoproliferativa a Con A de células humanas o de ratón infectados podría deberse a una alteración irreversible o reversible en dichas células. Una falla en la capacidad de las células de unir o transducir la señal de activación dada por la linfoquina o por los antígenos o mitógenos, o bien al requerimiento de otras linfoquinas. En otras palabras, el bloqueo podría producirse indirecta o directamente sobre este sistema IL-2/IL-2 receptor. De ser esta última posibilidad verdadera, el bloqueo podría estar dado por falta de expresión del receptor de la linfoquina, o por una falla en la transducción de la señal dada por la unión del ligando al receptor.

La deficiente respuesta proliferativa de animales en la fase aguda de infección también han sido atribuidas a la actividad de células adherentes, que producen factores supresores (45,46).

Estos factores supresores no fueron detectados al variar la cepa de ratón utilizada en la infección (252), indicando nuevamente la importancia tanto de la componente genética del huésped como del parásito en el desarrollo de la infección.

La inmunodepresión observada *in vitro* no se debería a la actividad de prostaglandinas (84, 107), que sí median la supresión observada en la infección con Leishmania major (68), Leishmania donovani (214) y trypanosomiasis africana (69), y ejercen un efecto inhibitorio sobre la producción de IL-2 (186). Recientemente se ha aislado una proteína de 15-16 Kd producido por esplenocitos de animales infectados con T.cruzi durante la etapa aguda de infección responsable de la supresión de respuestas proliferativas a mitógenos *in vitro* (231).

Factores solubles inespecíficos son producidos por monocitos de pacientes con lepra lepromatosa. Estas moléculas son capaces de inhibir la respuesta de células T de pacientes con lepra tuberculoide a antígenos específicos y mitógenos (162,210). La actividad de estos factores inhibitorios podría conducir a la supresión de la respuesta T, responsable de la diseminación de la infección en pacientes lepromatosos.

Durante la infección experimental con Trypanosoma cruzi también ha sido descrita la actividad de factores solubles producidos, capaces de inhibir la inducción de respuestas de hipersensibilidad retardada (130,131). Dichos factores de peso molecular de 30 a 50 Kd (131) serían producidos por células T de animales infectados con T.cruzi cuatro semanas después de la infección (130).

1.8.4: ALTERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE DURANTE LA FASE CRONICA DE LA INFECCION

En la fase crónica de infección existe un restablecimiento de parcial o total de la respuesta inmune, según el parámetro inmunológico estudiado, la cepa de parásito y la especie y cepa de animal utilizada. Se han obtenido evidencias de respuesta inmune celular en pacientes chagásicos en experiencias *in vivo* e *in vitro*, aunque siempre hay casos de falta de respuesta. Los parámetros de respuesta inmune celular estudiados en pacientes fueron: la capacidad de responder con transformación blástica a la estimulación con diferentes fracciones subcelulares del parásito (58, 80), o parásitos inactivados (153,154,268), la producción factores activadores de macrófagos (capacidad que correlaciona con

la respuesta linfoproliferativa a antígenos del parásito) (169), o de inhibición de la migración leucocitaria, al estimular células con fracciones del parásito (126, 127, 176).

La mayor parte de los autores encuentra respuesta negativas de hipersensibilidada retardada *in vivo* frente a diferentes antígenos u homogenato total del parásito son negativas (176) y sólo algunos encuentran respuestas positivas.

La capacidad proliferativa a diferentes preparaciones antigénicas en la etapa crónica ha sido correlacionada al estado clínico del paciente (56, 80). La capacidad de responder a mitógenos no se ve alterada para la mayoría de los autores (58), aunque algunos encuentran respuestas reducidas (44).

En animales de experimentación, tanto infectados crónicamente como inmunizados con fracciones subcelulares del parásito, es mas constante la presencia la de respuesta inmune celular.

La respuesta proliferativa a antígenos del parásito ha sido documentada en ratones de mas de 60 días de infección (27,106) aunque su presencia depende de la cepa de ratón empleada (171). Aunque varios autores describen la presencia de reacciones de hipersensibilidada retardada (27, 137), se ha descripto la presencia de células T supresoras capaces de inhibir dicha actividad durante la fase crónica de infección (1,212). Los distintos grupos de investigación coinciden en cambio en cuanto a la capacidad de antígenos de la forma tripo o epimastigote del parásito, en presencia de BCG, adyuvante completo de Freund, o saponina de inducir respuestas DTH (2,212).

Otro parámetro presente en los animales infectados es la capacidad de producir factores capaces de activar macrófagos para la destrucción intracelular del parásito (167).

1.9: PAPEL DE CELULAS FAGOCITICAS MONONUCLEARES EN LA RESISTENCIA A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

Un área en la que sí parece haber acuerdo es en el papel del sistema de los fagocitos mononucleares en la resistencia a la infección con T.cruzi. Los trabajos del grupo de Nogueira y colaboradores (166) indican claramente que estas células son capaces de destruir a los parásitos internalizados cuando son activados por linfoquinas producidas por linfocitos T sensibilizados por la presencia de antígenos del parásito en el individuo sensibilizado (167).

Linfoquinas producidas por células T estimuladas con mitógenos u antígenos no relacionados también son capaces de activar al macrófago.

Los macrófagos activados sufren diferentes modificaciones, algunas de las cuales como el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno han sido correlacionadas a su acción parasiticida (164). Otras modificaciones son la estimulación de la actividad tumoricida inespecífica, la inducción de antígeno Ia, el aumento de la expresión en superficie del receptor para Fc, o del receptor C3b de complemento y la producción de factor activador de plasminógeno, la producción de factores de la cascada del complemento. Los macrófagos activados jugarían un papel en la resistencia a la infección *in vivo* no solo por su capacidad

triptanocida, a través de la producción de radicales libres de oxígeno, sino también por la modulación que ejercen en la respuesta inmune.

La destrucción de parásitos por macrófagos tendría gran importancia *in vivo*, ya que el T.cruzi es un parásito intracelular obligado de entre otras células los fagocitos mononucleares. Una evidencia de que el sistema "estímulo T-linfoquinas-macrófagos" estaría involucrado en la resistencia a la infección se obtuvo al comparar la susceptibilidad a la infección con parásitos de las cepas Y y CL en ratones endocriados con la capacidad de sus células esplénicas de generar factores estimulantes de macrófagos en presencia del estímulo específico o de mitógenos.

Los linfocitos provenientes de ratones resistentes C3H generan mayores niveles de estas linfoquinas, y más tempranamente, que los de la cepa susceptible BALB/c. Estas células T generadoras de linfoquinas, transfirieron resistencia pasiva a la infección (170). Además de producir factores activadores un contacto célula T-macrófago participaría en la activación parasiticida de este último (165).

1.10: PAPEL DE INTERFERON GAMMA Y OTRAS LINFOQUINAS EN LA RESISTENCIA A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

Los interferones son una familia e proteínas capaces de prevenir la replicación viral, e inducir la síntesis de ARN y proteína. Han sido clasificados como: interferón de tipo I, inducido clasicamente por infecciones virales y estímulos bacterianos. Esta familia incluye el interferón α y el interferón

β producidos por leucocitos y fibroblastos respectivamente. El interferón de tipo II o interferón τ es sintetizado por linfocitos T sensibilizados (tanto Lyt2.2 como L3T4 positivos) o células NK (262). El interferón τ es uno de los factores solubles que intervienen en la diferenciación de células B antígeno específicas y es capaz de aumentar el potencial citotóxico de células NK si bien es mucho menos efectivo en este último aspecto que el interferón de tipo I.

En el humano el interferón τ tiene naturaleza glicoproteica, y consta de dos especies activas de 20 y 25 Kd que pueden formar un dímero.

Ejerce su actividad sobre la célula luego de unirse a su receptor celular. Una vez unido es internalizado y degradado. La unión desencadena la síntesis de ARN y polipéptidos, algunos de los cuales son comunes en la unión de interferón α, β y τ . El interferón τ actúa sinérgicamente con la linfoxina en la inhibición de la proliferación de células tumorales, induce la expresión de moléculas de clase I del complejo de histocompatibilidad, actividad también llevada a cabo por el interferón de tipo I, e induce la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II sobre la superficie celular de macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas, células endoteliales, linfocitos B y algunas líneas tumorales (282). La inducción de la expresión de antígenos de histocompatibilidad tiene evidentes implicancias en la regulación de la respuesta inmune, ya que las células que los expresan son capaces de presentar antígeno o son susceptibles al reconocimiento por células T citotóxicas. El interferón τ también induce un aumento en

la expresión del receptor Fc para IgG de alta afinidad (FcR1) sobre neutrófilos (178), lo que junto a su capacidad de activar mecanismos citolíticos aumenta las reacciones de citotoxicidad dependiente de anticuerpo.

Es el principal componente del factor activador de macrófagos, induciendo o aumentando su citotoxicidad contra distintos tipos de células tumorales, bacterias (103, 202) y parásitos (163, 159, 279) así como también activando en neutrófilos el metabolismo de oxígeno, involucrado en la resistencia contra T.cruzi (164). El interferón γ es capaz de inhibir el crecimiento de parásitos intracelulares en células distintas a los macrófagos. Inhibe por ejemplo el crecimiento de Rickettsia prowazekii en fibroblastos murinos (269). Este papel podría ser importante en la evolución de la infección con T.cruzi, microorganismo que es capaz de parasitar células no fagocíticas.

En estudios *in vitro* el interferón γ es capaz de activar macrófagos para la actividad tripanocida (175, 181, 182, 279). Este efecto está mediado por la producción de peróxido de hidrógeno (279).

Ha sido postulado un efecto sinérgico entre el interferón γ y anticuerpos anti-T.cruzi en la actividad parasiticida, debido tal vez a un aumento en la fagocitosis de los parásitos opsonizados por anticuerpo.

La administración de interferón- γ *in vivo* resulta en la inducción de actividad anti-tripanosoma (181). No se han realizado hasta el momento mayores esfuerzos en el estudio de esquemas, vías de administración o dosis efectivas de interferón γ en la protección.

En este sentido, se ha encontrado que bajas dosis de interferón τ eran capaces de ejercer un efecto adyuvante en la inmunización protectora contra Plasmodium yoelii, agente causal de la malaria murina (183). La administración *in vivo* de interferón τ en animales infectados con Leishmania donovani (161) resulta en una atenuación de la patología, sugiriendo su utilización en la inmunoterapia de la infección.

Si bien el interferón τ parece ser la principal linfoquina en la activación de macrófagos para la actividad parasiticida, otras citoquinas como el factor de necrosis de tumores (TNF)(57) y el factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF)(190, 272) han sido capaces de activar macrófagos para la destrucción de T.cruzi.

Estos mecanismos, de regulación de la respuesta inmune protectora dependiente del timo actuarían en el balance huésped parásito aun en las primeras etapas de la infección, ya que el estudio temprano del chagoma de inoculación revela la destrucción de parásitos por macrófagos en el sitio de entrada.

1.11: RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y EL PAPEL DE LOS ANTICUERPOS EN LA RESISTENCIA A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

La existencia de anticuerpos circulantes en la Enfermedad de Chagas se conoce desde que los primeros investigadores detectaron anticuerpos fijadores de complemento en pacientes (Guerreiro-Machado, 1913).

La detección de anticuerpos es actualmente, el criterio diagnóstico de certeza de infección por T.cruzi. En los sujetos infectados los anticuerpos específicos se conservan siempre presentes sin que, hasta el presente, se conozcan datos que demuestren fluctuaciones temporales significativas en sus títulos a lo largo del periodo crónico de la enfermedad.

La activación policlonal antes mencionada podría al menos en forma parcial ser responsable de la rapidez en la detección de anticuerpos durante la infección. Como en toda primoinmunización la primer inmunoglobulina específica detectada es la IgM, que aparece 3-4 días después de la infección y presenta su máxima concentración hacia los días 15-20, para luego descender.

Este descenso es acompañado de un aumento de la IgG específica, que se hace detectable 10-15 días después de la infección (220, 271). Se ha postulado una restricción en el perfil de las subclases de anticuerpo IgG presentes en la infección, encontrándose en ratones las subclases IgG 1 e IgG 3 a muy bajos niveles (215). En pacientes se encuentran IgG1 e IgG 3 en mayores niveles que IgG2 o IgG4, en coincidencia con el análisis de células formadoras de placas.

La infección por T.cruzi en humanos (43) o en modelos experimentales es capaz de inhibir la respuesta inmune humoral contra antígenos heterólogos. Esta supresión ha sido correlacionada con la resistencia (250), y depende de la vía de inoculación del antígeno heterólogo, la cepa de ratón y la cepa del parásito utilizada. Durante la infección aguda se ve una disminución de la respuesta contra eritrocitos heterólogos (38, 47), TNP-Ficoll, TNP-BGG (191), LPS o TNP-Brucella abortus. Por este sistema fue detectada en cambio por este sistema la presencia de células T colaboradoras específicas de antígenos de superficie de T.cruzi.

Durante la infección crónica se restauran parcialmente las respuestas a TNP-Ficoll y TNP-BGG, pero permanecen suprimidas las respuestas a glóbulos rojos heterólogos. En esta fase se restaura la capacidad de formar estos anticuerpos por el agregado de IL-2 en el cultivo o por la administración in vivo de la linfoquina (51, 189, 191, 253).

La respuesta inmune humoral también actúa en la resistencia a la infección con T.cruzi. La transferencia de suero de animales infectados crónicamente confirió protección parcial contra la infección con el parásito en la mayoría de los estudios. A pesar de esto existen algunas combinaciones de cepa del parásito y huésped que no genera en la infección anticuerpos capaces de transferir resistencia. En los casos en que el suero de ratones crónicamente infectados transfiere resistencia, los anticuerpos de la subclase IgG 2a y 2b median la protección de los receptores (215, 247). Sin embargo no se conoce la actividad biológica de los anticuerpos que importa en la protección. En diferentes

trabajos, se ha correlacionado la resistencia con la presencia de líticos para el parásito. La presencia de anticuerpos líticos, a su vez a sido correlacionada con la de anticuerpos mediadores de ADCC (132), y citofílicos para el macrófago (123).

Sin embargo estos anticuerpos alcanzan niveles similares en ratones susceptibles o resistentes a la infección.

Krettli y colaboradores (119) observaron que en el suero del huésped crónicamente infectado existen anticuerpos aglutinantes y mediadores de lisis por complemento de los parásitos. Dichos anticuerpos son inducidos por antígenos presentes en las formas tripo y amastigote del parásito, pero no por formas epimastigote, y son capaces de transferir protección al desafío. Los anticuerpos mediadores de la lisis con complemento han sido encontrados en todos los pacientes chagásicos estudiados, aunque en títulos bajos (120). La eliminación de la infección por el tratamiento con drogas tripanocidas se acompaña con la desaparición de los anticuerpos líticos.

A pesar de ello la lisis con complemento de los tripomastigotes no parece ser un mecanismo efectivo para la destrucción del parásito en la fase aguda de la infección, ya que durante esta etapa los animales deficientes en complemento muestran una parasitemia y mortalidad similar a la de los animales normocomplementémicos (53, 270). Por otro lado a pesar de que la lisis por complemento actuaría por la vía alterna de la cascada, fragmentos Fab (que son capaces de mediar la lisis por complemento) no son capaces de mediar transferir resistencia a la infección (270). Existen además cepas de parásitos incapaces de inducir anticuerpos líticos durante la infección (284), lo que

sugiere que la importancia de este mecanismo dependería de la componente genética del parásito. Sin embargo, un papel de este mecanismo efector en el control de la parasitemia no debe descartarse.

Los anticuerpos involucrados en las reacciones de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) podrían estar involucrados en la protección. Las reacciones ADCC tienen bajos requerimientos de anticuerpos, son llevadas a cabo por células normales que están disponibles en alta concentración en el organismo y llevan a la destrucción rápida y efectiva del blanco. Se encontró además que los niveles de anticuerpo mediador de ADCC eran mayores y aparecían más tempranamente en ratones Swiss resistentes a la infección que en los ratones susceptibles BALB/c, inoculados con la cepa Tulahuen de T.cruzi (31). *In vitro* las reacciones ADCC dirigidas contra parásitos son llevadas a cabo por células fagocíticas con receptor de Fc. En el humano se ha medido la actividad ADCC contra el parásito por monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. En ratones normales la actividad ADCC contra parásitos ha sido determinada en células polimorfonucleares y mononucleares adherentes o no adherentes de bazo o peritoneo. Esta actividad también es llevada a cabo por células de bazo de ratones infectados, aun durante la etapa aguda de infección. La actividad ADCC contra T.cruzi de células no fagocíticas con receptor Fc, como las células Killer (K) es controvertida, y probablemente, la actividad detectada en algunos casos (81) se deba a contaminaciones en las preparaciones celulares usadas.

Si bien ha sido documentada la actividad ADCC por células fagocíticas mononucleares (macrófagos o monocitos) contra la forma tripomastigote del parásito, no debe descartarse la posibilidad de que la lectura microscópica indique un aumento de fagocitosis y no una destrucción de la forma tripomastigote del parásito. En este aspecto, los anticuerpos actuarían aumentando la fagocitosis en los macrófagos, pero esto no resultaría en la destrucción de los parásitos en macrófagos normales.

La serie de procesos que se desencadenan luego del contacto estrecho entre la célula efectora de ADCC y un parásito sensibilizado depende del tipo de célula y de su estado funcional, que está modulado por otros componentes del sistema inmune como la presencia de linfoquinas (96). Los macrófagos y los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares son las células más estudiadas. En estas células, junto con el proceso fagocítico, se desencadena la liberación de enzimas lisosomales y el incremento brusco del metabolismo aeróbico celular.

Tanto los epimastigotes como los tripomastigotes son fagocitados por macrófagos humanos y de ratón. Los epimastigotes son destruidos, pero los tripomastigotes escapan desde la vacuola fagocítica al citoplasma, donde se replican. Si los macrófagos están activados por efectos de productos de células T sensibilizadas, ocurre la destrucción de los parásitos internalizados. La opsonización de los parásitos incrementa la entrada a los macrófagos no activados, pero no aumenta su destrucción. En cambio, la presencia de anticuerpo incrementa la destrucción por macrófagos activados, indicando un efecto

sinérgico entre los anticuerpos y la producción de factores activadores (168).

Los monocitos humanos y de ratón, los leucocitos polimorfonucleares humanos, neutrófilos y eosinófilos, también son capaces de destruir a epimastigotes y tripomastigotes de T.cruzi sensibilizados o en presencia de anticuerpos específicos (30, 110, 172). El pretratamiento de las células efectoras con los antisueros no estimula la reacción, indicando que no hay anticuerpos citofílicos implicados en la misma (172). Los anticuerpos ADCC, aunque en niveles variables, fueron encontrados en todos los pacientes chagásicos estudiados y la actividad se halla localizada en la fracción IgG (173). Por otro lado, el mecanismo ADCC podría dirigirse contra células autólogas parasitadas si estas expresan antígenos del parásito reconocidos por los anticuerpos (134), o contra células autólogas, por lo que este mecanismo interviene en fenómenos autoinmunes postulados en la patogénesis de la Enfermedad.

2: OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la caracterización de células y mecanismos inmunológicos que participan en la evolución de la infección experimental con Trypanosoma cruzi en relación a la resistencia , y la regulación de estos elementos.

Los objetivos específicos son:

-Caracterización de elementos celulares involucrados en la resistencia natural a la infección experimental.

-Medición de parámetros de la respuesta inmune celular y humoral, adquiridos por la inmunización de ratones, y análisis de su papel en la resistencia a la infección experimental en comparación con los presentes en animales crónicamente infectados.

-Caracterización de alteraciones del sistema inmune durante la infección experimental, con especial énfasis en la producción y respuesta a linfoquinas.

-Caracterización de mecanismos moleculares de estas alteraciones.

-Estudio de la modulación de la respuesta inmune protectora por linfoquinas.

3: MATERIALES Y METODOS

3.1: PARASITOS

Se utilizaron parásitos de la cepa Tulahuen (248) de T.cruzi. Las formas sanguíneas se obtuvieron por pasaje semanales en ratones de la cepa BALB/c o NIH, por la infección de 10^5 parásitos.

Las formas epimastigotes se cultivaron en medio LIT. También se utilizaron tripomastigotes obtenidos en sobrenadantes de células Vero o L-929 infectadas 7 a 9 días antes.

3.2: ANIMALES

Se utilizaron ratones machos , de 5 a 10 semanas de edad al comienzo de las experiencias, pertenecientes a las cepas BALB/c, C3H , C57BL/6, y NIH.

Los animales fueron mantenidos en nuestro laboratorio, alimentados con alimento balanceado y agua acidificada ad libitum.

3.3: ANTIGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI

Se prepararon fracciones subcelulares a partir de las formas epimastigotes de T.cruzi segun descripto en la literatura (76, 226, 227). Se cosecharon parásitos de 6 días de cultivo en medio monofásico. Los parásitos se lavaron y se rompieron por presión-descompresión. El homogenato total (HT) y la fracción microsomal (Mc) se obtuvieron por centrifugación diferencial de esta suspensión. La fracción subcelular flagelar se obtuvo a partir de un gradiente discontinuo de sacarosa realizado con el homogenato total del parásito. Los antígenos Mc y F asi obtenidos se utilizaron para inmunizar ratones. Para trabajar con material mas homoganeo, en las reacciones *in vitro*, y en el ensayo de hipersensibilidad retardada, los antígenos fueron sonicados (Branson Sonic Power) por 1 minuto a 90 Watts en hielo, con un microtip standard.

El material sonificado fue centrifugado durante 30 minutos a 16.300 g (rotor B4 Sorvall RC-2B), el sobrenadante fue fraccionado y conservado a -70 C hasta su utilización (58). El contenido proteico fue determinado por el metodo de Folin, utilizando albumina bovina como standard (136).

Los tripomastigotes del sobrenadante de células infectadas fueron cosechados centrifugados a 11000 rpm durante 20 minutos. Los parásitos fueron entonces suspendidos en PBS-0.5% BSA, lavados dos veces y llevados a 2×10^7 parásitos/ml. Luego se los inactivó por calor durante 10 minutos a 80°C.

Los parásitos asi tratados se fraccionaron y conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.4: ESQUEMA DE INMUNIZACION

Ratones de la cepa BALB/c de 5 semanas de edad al comienzo de la experiencia recibieron intraperitonealmente (ip) 3 dosis de los antígenos de Trypanosoma cruzi, cada quince días. Cada dosis contenía 200 µg o 1 mg de proteína de la fracción F o Mc respectivamente. Cuando se indica la fracción F fue administrada adyuvada (FBp) con 1.25×10^8 unidades por dosis de Bordetella pertussis (Bp), cepa 10536 cedida por E. Duhard del Instituto Nacional de Microbiología Carlos Malbran(207). El desafío con 50 formas sanguíneas del parásito (aproximadamente 1 dosis letal 50) de animales inmunizados y controles se realizó un mes después de la administración de la última dosis.

3.5: INFECCION EXPERIMENTAL DE RATONES

El desafío con parásitos se realizó ip, utilizando formas sanguíneas en 0.5 ml de PBS con 1% de suero fetal bovino (SFB).

La parasitemia se determinó periódicamente en 5 µl de sangre venosa de la cola (24), y fue registrada la mortalidad.

3.6: ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA)

El contenido de anticuerpos en suero se determinó mediante un ensayo de ELISA indirecto, a partir de una modificación de la técnica descrita por Voller (274). Este ensayo se utilizó para determinar la concentración de anticuerpos específicos en suero, así como para cuantificar inmunoglobulinas de hibridomas producidos como ascitis o como

sobrenadante de cultivo. En el primer caso el HT de T.cruzi , diluido a una concentración de 200 µg/ml en buffer carbonato bicarbonato (pH 9.6) , y en el segundo, anticuerpo anti-ratón en conejo (Dakopatts) 100 µg/ml en el mismo buffer se adsorbieron a placas de 96 pocillos , con fondo en U (Linbro , Flow Lab Inc, Handem, CT) a 4 C durante la noche. Después de lavar las placas con PBS conteniendo 0.01-% de Tween 20 (PBS-Tween) 3 veces, las placas fueron bloqueadas por la adición de una solución 5-% suero de cabra en PBS (PBS-cabra).Se incubó por 1 hora a 37 C y se lavaron 3 veces con PBS-Tween. Se agregó entonces el suero o el sobrenadante problema, diluido 1:400 en PBS-cabra. Después de 1 hora de incubación a 37C y otro lavado con PBS-Tween , se añadió antisuero de cabra anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (Byossis ,Compiègne, Francia) diluido 1:400 en PBS-cabra. El antisuero marcado se incubó durante 1 hora a 37C, se lavó repetidamente y se añadió el sustrato o-fenilendiamina. La reacción se frenó con una solución 2.5N de HCl. El ensayo fue leído en un lector (micro ELISA minireader MR 590, Dynatech Lab, Alexandria, VA) , utilizando un filtro de 492 nm. Para los análisis estadísticos se utilizó la media de la absorbancia de los triplicados.

3.7: ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Células de bazo después o antes del cultivo , se distribuyeron en placas de 96 pocillos con fondo en V (Sterilin, Inglaterra) (10^4 células/pocillo) en un volumen final de 200 μ l. Las células se tiñieron con anticuerpo de rata anti Thy 1.2. de ratón, anti L3T4, anti Lyt 2.2, anti IgG de ratón (Biossis, Francia), o anticuerpo de rata biotinilado anti el receptor IL-2 del raton, 7D4, (139), diluidos a la concentración adecuada en PBS-1%BSA y NaN₃, por 45 minutos en hielo. Después de dos lavados con PBS-BSA-NaN₃, se añadió una solución de antisuero de ratón anti IgG de rata marcado con fluoresceína o estreptoavidina -marcada con fluoresceína (Amersham) por 45 minutos a 4 C. Las células se lavaron luego dos veces y la marca se analizó en un analizador activado por fluorescencia (FACS , Becton -& Dickinson, USA) o en un microscopio de fluoscencia de epiiluminación (Zeiss, Jena, Alemania Oriental). Todos los anticuerpos monoclonales utilizados se obtuvieron como sobrenadantes de cultivo , excepto el 7D4, cedido por el Dr T. Malek.

Se realizó del mismo modo inmunofluorescencia directa utilizando una dilución 1/10 de anti Thy 1.2 (New England Nuclear, Ma, EEUU) o anti IgG de ratón (Biossys, Francia) marcados con isotiocianato de fluoresceína.

3.8: PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA

La prueba de hipersensibilidad retardada se realizó por la inoculación en la almohadilla plantar trasera de ratones BALB/c de 30 μ l de HT (50 μ g) , F (80 μ g) o Mc (80 μ g). El grosor de la almohadilla plantar inoculada asi como el de la contralateral , fue medida por un calibre micrométrico (L.S. Starret Co, Athol, MA) dos días después de la inoculación. Los resultados se expresaron como indice de induración o estimulación (IE):

Grosor de la almohadilla inoculada/grosor de la contralateral:

3.9: OBTENCION DE CELULAS DE BAZO Y GANGLIO

Bazo y ganglios popliteos fueron obtenidos quirurgicamente de ratones anestesiados con eter, sangrados por la vena retroorbital, y sacrificados por dislocación cervical. Para obtener una suspensión unicelular, los órganos fueron disgregados utilizando un homogeneizador de tejidos (Potter, Ten broek), o un tamiz de acero inoxidable de 100 μ m de poro. Las células se lavaron con medio RPMI 1640 (GIBCO Lab), penicilina (100 U/ml), 100 μ g/ml estreptomycin , 20 mM de HEPES, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, y 10 -% de suero fetal bovino (Gibco Lab) (RPMI-10-%). Los glóbulos rojos se lisaron con un golpe hipotónico utilizando CINH4 0.8%. Las células remanentes fueron lavadas utilizando RPMI 10%, centrifugando a 1500 rpm 10 minutos 3 veces, contadas en una solución 2% de azul tripan en PBS y ajustadas a la concentración indicada.

3.10: TRANSFERENCIA PASIVA DE CELULAS LINFOIDES O SUERO INMUNE

Células de bazo de animales inmunizados, un mes después de la última dosis o de animales crónicamente infectados, fueron obtenidas como se describió en la sección anterior. Las células fueron suspendidas en RPMI-10% en la concentración indicada y transferidas por vía endovenosa (iv) por la vena de la cola, en un volumen de 200 μ l de RPMI 10-% SFB o intraperitonealmente (ip) en 0.5 ml de medio. Luego de 24 horas después se realizó el ensayo de hipersensibilidad retardada según se describió en la sección 3.8, inoculando HT, o el desafío con 50 tripomastigotes sanguíneos Tulahuen, midiéndose parasitemia y registrándose la mortalidad de los grupos durante la infección.

3.11: ENSAYO DE LINFOPROLIFERACION

Los ensayos de linfoproliferación se realizaron por triplicado, distribuyendo 3×10^5 células /pocillo en placas de 96 pocillos, con fondo plano (Costar, N 3596, Costar, Cambridge, MA) en un volumen final de 200 μ l. Para realizar la estimulación inespecífica, se añadió Concanavalina A (ConA) (Sigma type IV, Sigma Chem Co, St Louis, MO) en una concentración final de 3 a 10 μ g/ml. Para la estimulación antígeno específica, se utilizó HT de T.cruzi en una concentración final de 15 μ g/ml. Siempre fueron incluidos pocillos controles en los que no se agregó antígeno o mitógeno. Las células fueron incubadas a 37 C. 5% CO₂ y atmósfera

humidificada, durante 72 horas en el caso de estimulación con Con A o 96 horas cuando se añadió HT.

Se adicionó 0.5 -1 μ Ci de timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{-Tdr}$) (New England Nuclear, Boston, MA), actividad específica 6.7 Ci/mmol) en cada pocillo 6 o 18 horas antes de la cosecha. Las células se cosecharon en papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF1), utilizando un cosechador (Minimash II, New York, NY) y la cantidad de radiactividad incorporada se cuantificó en un contador de centelleo líquido (LKB Bromma, Suecia).

Los cultivos no estimulados incorporaron de 1000 a 5000cpm de $[^3\text{H}]\text{-Tdr}$. Los resultados se expresaron como cpm +/- error standard de la media de triplicados realizados o como índice de estimulación (IE): cpm media de cultivos estimulados/cpm media de controles no estimulados.

3.12: SEPARACION DE CELULAS ADHERENTES POR PASAJE EN COLUMMNA DE SEPHADEX G-10

Las células adherentes del bazo y ganglios de ratones BALB/c crónicamente infectados se separaron en una columna de Sephadex G-10, según descrito (150). Se colocaron en una jeringa de vidrio de 50 ml, 45 ml de Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Suecia) previamente hidratado. Se lavó la columna con 100 ml de RPMI-10% SFB y 20 mM HEPES. Se sembraron 0.5 a 1 10^7 células de bazo y ganglio de animales crónicamente infectados. Al penetrar las células, se añadieron de 15 a 20 ml de medio de cultivo, y se colectaron 10-15 ml.

Toda la separación se realizó a temperatura ambiente. Las células eluidas fueron lavadas dos veces en RPMI-10% SFB.

El rendimiento de la columna fue de un 35% de las células totales sembradas. Se caracterizó las poblaciones B y T por inmunofluorescencia directa utilizando anti Thy 1.2 (New England Nuclear, USA) o anti IgG murino (Biossis, Francia) marcados con isotiocianato de fluoresceína, según se describió en la sección 3.7. Antes de la separación había 27% de células T y 55% de células B. Después de la separación se obtuvo 54 % de células T y un 37 % de células B, lo que indica que las proporciones de ambas subpoblaciones son diferentes ($p < 0.01$ prueba de Chi cuadrado) con pérdida selectiva de linfocitos B.

3.13: SEPARACION DE CELULAS ADHERENTES A LA LANA DE NYLON

Se enriqueció en células T a células de bazo y ganglio por pasaje a través de una columna de lana de nylon (LP-1 Leuko-Pak Leukocyte Filters, Fenwall Labs, IL, EEUU) (91).

La lana de nylon utilizada fue pretratada con HCl 0.1M a temperatura de ebullición durante 30 minutos. Se lavó repetidamente con agua destilada e incubó en agua durante 24 horas y se secó a 37C durante dos a cuatro días.

Se colocaron 2.5 gr de lana de nylon así tratada en una jeringa de plástico de 35 ml, en un volumen de 24 ml y se lavó la jeringa con 100 ml de RPMI-5% SFB a 37 C, luego de lo cual la columna, cerrada y equilibrada con medio de cultivo se incubó durante 1 h a 37C. Se sembraron luego 4×10^6 células, ajustadas a una concentración de $5 \cdot 10^7$ células/ml en medio de cultivo. Al penetrar las células, se agregó 1 ml de medio, se cerró la columna y se la incubó a 37 C durante 1 h. Se lavó entonces la columna con 50 ml de medio de cultivo y se colectaron los

primeros 12 o 15 ml. Las células eluidas se lavaron y resuspendieron en medio. El rendimiento de la columna fue de un 25% (7.10^7 células) de células no adherentes.

Se caracterizó células B y T por inmunofluorescencia directa según se describió en la sección 3.7, antes y después del pasaje por la columna. Las células sembradas estaban constituidas por un 58% de células B y un 36% de células T, las células no adherentes estaban constituidas por un 6% de células B y un 81% de células T, siendo las proporciones significativamente diferentes de las de la población sembrada.

3.14: SEPARACION DE CELULAS CON RECEPTOR IgG POR EL METODO DE PANNING (ADSORCION)

Se deplecionó a células de bazo de ratones BALB/c crónicamente infectados de células B por su capacidad de unirse a anti IgG murina adsorbida a una superficie de plástico como soporte (129).

Para ello se adsorbieron 2 ml de Fab anti IgG de ratón (Byossis, Francia), 1mg/ml en PBS a un frasco de cultivo de 25 cm² (Corning, USA) durante 18h a 4°C. El frasco fue lavado con 5 ml de PBS, y se sembraron 3 ml de la suspensión que contenía $13.5.10^6$ células/ml en medio de cultivo sin bicarbonato de sodio. Se incubó durante 1 hora a 37°C, agitando suavemente cada 15 minutos. Se retiraron las células no adherentes con una pipeta Pasteur, cuidando de no tocar la superficie de adsorción y se lavó el frasco con 3 ml de medio de cultivo. Se recogieron $3.5.10^6$ células, lo que implica un rendimiento de 26%, y se caracterizaron células B y T por inmunofluorescencia directa

segun se describió previamente. La población sembrada estaba constituida por un 63% de células B, después del panning habían un 6% de células B.

3.15: DEPLECION DE SUBPOBLACIONES CELULARES POR TRATAMIENTO CON ANTICUERPO ANTI DISTINTOS MARCADORES DE SUPERFICIE Y COMPLEMENTO

Para deplecionar en diferentes subpoblaciones linfoides, se trató suspensiones de células de ratones BALB/c a diferentes tiempos después de la infección con anticuerpos contra diferentes marcadores de superficie y complemento (90) Las células, 10^7 /ml, en solución salina balanceada (BSS), fueron incubadas a 4 C durante 1 hora en presencia de anti Thy 1.2, anti Lyt 2.2 o anti Lyt1.2 (Cedarlane, Canada) en una concentración final de 1/20. Las células se centrifugaron y se las resuspendió en el volumen original, en una solución de complemento de conejo (Pel-Freeze, Canada) 1/20 en BSS. Las células se incubaron durante 60 minutos a 37 C y se lavaron dos veces en RPMI-10% SFB.

El anticuerpo monoclonal anti Thy1.2 fue titulado para su utilización por inmunofluorescencia directa, según se describió en la sección 3.7. Antes del tratamiento se observaron 68% de células B y 25% de células T. Después del tratamiento, la población celular contenía un 3% de células T y un 79% de células B.

3.16: ADMINISTRACION DE ANTICUERPOS CONTRA SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS IN VIVO

Un grupo de animales fue inoculado ip con 0.7 mg de anticuerpo monoclonal IgG de rata contra el determinante L3T4 (276), producido por el hibridoma GK 15, comprado en ATCC. Los anticuerpos fueron cosechados como ascitis de animales BALB/c irradiados subletalmente y cuantificados por ELISA, segun se describió en la sección 3.6 .

Se administraron iv 100 μ l de una dilución 1:5 en PBS de antisuero policlonal de conejo anti asialo GM-1 (101) (Wako Pure Chemical Industries, Japon) en un segundo grupo de ratones.

Un tercer grupo fue tratado ip con 500 μ g de anti Thy 1.2, del hibridoma HB 23, cosechado como ascitis de ratones BALB/c pretratados con Pristane.

Un grupo de animales de la cepa C57BL/6 fue tratado con ascitis conteniendo el anticuerpo monoclonal NK1.1 (101), cedido gentilmente por la Dra. Gloria Koo de la empresa Merck, Sharp y Dhome. Los grupos controles fueron inoculados con 100 μ l de suero normal de rata.

3.17: ENSAYO DE CELULAS FORMADORAS DE PLACAS

Se trataron 3 animales BALB/c con anti L3T4 como se describió en la sección anterior (3.16). Estos y animales no tratados se inmunizaron 3 y 13 dias después con 4×10^8 glóbulos rojos de carnero (GRC) por vía endovenosa.

Después de 4 días de la inmunización secundaria, se obtuvieron células de bazo y se las resuspendió en SSB (solución salina balanceada). El número de células secretoras de anticuerpos se evaluó utilizando una modificación del ensayo de Jerne (65). Se agregaron 2×10^5 células de animales inmunizados y 2×10^5 células de animales vírgenes, a 0.5% de agar en SSB, conteniendo 0.75 ng/ml de DEAE dextran, 25 μ l de una suspensión 10% de GRC en BSS y 25 μ l de una dilución 1:3 de suero de cobayo como fuente de complemento. La suspensión se volcó en placas de Petri de 9 cm de diametro. Para la evaluación de células formadoras de placas indirectas, se agregó a la suspensión 25 μ l de una dilución de antisuero de conejo anti-ratón (DAKOPATTS, Dinamarca). Se incluyeron controles en los que no se agregó complemento o células de bazo.

Las placas de Petri se incubaron a 37 C durante 90 minutos y las placas se contaron por observación directa.

Los resultados se expresaron como la media del número de células formadoras de anticuerpo en 10^5 células de bazo.

3.18: ENSAYO DE ACTIVIDAD NATURAL KILLER (NK)

Se realizó un ensayo de liberación de ^{51}Cr de células YAC-1 para medir el potencial citotóxico de células NK (185). Células YAC-1 (1 a $3 \cdot 10^4$) se marcaron con 100 μCi de $\text{Na}_2\text{O}-^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ 1 hora a 37C. Las células se lavaron repetidas veces y se ajustaron a una concentración de $5 \cdot 10^5$ /ml. Esta suspensión se distribuyó en placas de 96 pocillos con fondo en V (Falcon), colocando 20 μ l/pocillo. Células de bazo obtenidas según descrito en la sección 3.8 se utilizaron como población

efectora. En algunos experimentos las células de bazo f pretratadas con 200 unidades por pocillo de interferón alfa (Stratec, Inglaterra) 2 horas a 37C. Las relaciones de efec blanco utilizadas fueron de 200:1 a 25:1 El volum reacción fue de 200 µl y el tiempo de reacción 4 horas, lue las cuales, se centrifugaron las placas (3 minutos 800 rp la radiactividad de 100 µl del sobrenadante fue medida contador gamma (LKB, Bromma, Suecia). Se incluyeron control células YAC-1 con RPMI-5-% SFB (control de liber espontanea) y con 0.05-% de NP-40 (liberación máxima).

Los resultados se expresaron como la media del porce de lisis específica:

$$\{[\text{cpm EXP} - \text{cpm ESPONT}] / [\text{cpm MAX} - \text{cpm ESPONT}]\} \cdot 100$$

3.19: ESTIMULACION IN VITRO PARA LA PRODUCCION INTERLEUQUINA-2

Se obtuvieron células de bazo de animales infectados en forma antedicha, y se las diluyó a $5 \cdot 10^6$ células/RPMI-10-% SFB.

La suspensión se cultivó a 37C, 5% CO₂ y atmó humidificada, con o sin el agregado de Con A (10 µg/ml). 48 horas, los sobrenadantes de cultivo (medio condicionado se cosecharon, esterilizaron por filtración (0.22 µm, Gel EEUU), fraccionaron y conservaron a -20 C.

3.20: DOSAJE DE INTERLEUQUINA-2

Se midió la actividad interleuquina 2 (IL-2) cultivando 3.10^4 células de la línea CTL.L (73), que es dependiente de IL-2 (cedida por el Dr Kendall Smith) por 24 horas, en presencia de distintas diluciones de MC, o de IL-2 recombinante.

Se determinó la cantidad de [3 -H]-timidina incorporada en los triplicados de la forma descrita en la sección 3.11, después de un pulso con 1 μ Ci (Amersham, actividad específica 6.7 Ci/mmol), 4 horas antes de la cosecha. Los resultados se expresaron como la media de la incorporación de [3 -H]-timidina (cpm).

3.21: ENSAYO DE UNIÓN UTILIZANDO IL-2 MARCADA RADIATIVAMENTE

El método utilizado para la medición de parámetros asociados a la unión de IL-2 a su receptor, fue una modificación del descrito por Robb y colaboradores (195) adaptado por Lindvisqt (133). Para remover IL-2 endógena, las células se incubaron 2 horas a 37 C en RPMI-5-% SFB, luego de lo cual se lavaron dos veces. Se distribuyeron las células en pocillos removibles en forma en U (Immulon, Dynatech, EEUU) Los pocillos removibles fueron pretratados durante una noche con una solución 13.6% en PBS de leche descremada. Las placas se centrifugaron durante 3 minutos a 1700 rpm y se descartó el sobrenadante. Diluciones seriadas del ligando no marcado se incubaron (en triplicado) en los pocillos que contenían el botón celular. Se resuspendieron las células antes del agregado de [125 I]-IL-2 (actividad específica 40 μ Ci/ μ g) (New England Nuclear, EEUU). El volumen final de la reacción fue de 40 μ l.

Después de una agitación breve, las placas se incubaron en hielo durante 20 minutos. Luego de esto se centrifugaron 3 minutos a 1700 rpm y se descartó los sobrenadantes, que contienen el ligando no marcado. Las células se lavaron 2 veces en frío en PBS-0.5-% albúmina bovina. Los pocillos, se contaron en un contador gamma (LKB, Bromma, Suecia). Se determinó la unión inespecífica en pocillos en los que se agregó 2000 veces de exceso de IL-2 fría respecto a la marcada.

3.22: ANALISIS DE SCATCHARD DE RECEPTOR DE IL-2 SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR

Los análisis de Scatchard presentados fueron realizados a partir de una reacción de competencia entre el ligando marcado, en este caso [125 I]-IL-2, y distintas concentraciones del ligando frío por el sitio de unión del receptor sobre la superficie celular.

El análisis permite conocer tanto el número de receptores como la afinidad del ligando por el mismo.

La reacción entre el sitio de unión de un receptor celular y su ligando se puede describir como :



La afinidad de la interacción entre el ligando y el receptor está dado por la constante de equilibrio:

En donde K_{eq} = constante de equilibrio; $[LIGANDO-RECEPTOR]$ es la concentración del complejo ligando receptor en la reacción en equilibrio.

La ecuación puede ser rearmada en forma tal que los datos experimentales pueden ser graficados como funciones lineales entre las variables en cuestión.

En la situación de equilibrio se cumple que:

$$[LIGANDO-RECEPTOR] = [LIGANDO UNIDO]$$

$$\text{y que } [RECEPTOR] = [RECEPTORES TOTAL] - [LIGANDO UNIDO]$$

Así la ecuación puede reexpresarse como:

$$[LIGANDO UNIDO] = K_{eq} \cdot ([RECEPTOR TOTAL] - [LIGANDO UNIDO]) \cdot [LIGANDO LIBRE]$$

o de otra forma :

$$[LIGANDO UNIDO] / [LIGANDO LIBRE] = K_{eq} [RECEPTOR TOTAL] - K_{eq} [LIGANDO UNIDO]$$

Un gráfico de $[LIGANDO UNIDO] / [LIGANDO LIBRE]$ contra $[LIGANDO UNIDO]$ es una línea recta cuya pendiente es " $-K_{eq}$ ", y en donde la intersección con el eje de abscisas ($[LIGANDO UNIDO]$) es igual a la concentración del receptor total. Esto es el gráfico o análisis de Scatchard.

El número de receptores sobre la superficie celular es:

El punto de interpolación de las curvas con la abscisa multiplicado por el número de Avogadro.

3.23: PREPARACION DE BLASTOS DE CONCANAVALINA A Y ENSAYO DE PROLIFERACION DE LOS MISMOS EN RESPUESTA A IL-2

Se prepararon blastos de ConA (6) por estimulación de células de bazo de ratones normales o infectados (21 dpi) con 10 µg/ml de ConA, por 48 h a 37C, 5% CO₂ en RPMI 10% SFB. Los blastos se lavaron 2 veces en BSS que contenía 20 mg/ml de alfa metil D manósido (Sigma), y se purificaron por centrifugación en un colchón de Ficoll Isopaque (Pharmacia, Suecia), durante 10 minutos a 1500 rpm y temperatura ambiente. Posteriormente las células de la interfase fueron lavadas dos veces con RPMI 5-% SFB. Se distribuyeron en placas de 96 pocillos con fondo plano (Nunc, Dinamarca) 10⁴ células/pocillo en RPMI-10-% SFB en un volumen final de 300 µl con las concentraciones indicadas de IL-2 recombinante. Las células se incubaron por 72 horas a 37 C, 5-% CO₂ y atmosfera humidificada. Antes de la cosecha las placas se incubaron durante 6 horas con 1 µCi de 3H-timidina (Amersham). La incorporación de radiactividad se determinó como descrito anteriormente (sección 3.8). Los resultados se expresaron como las cpm medias + el error standard de la media de los triplicados realizados.

3.24: ADMINISTRACION IN VIVO DE LINFOQUINAS

Antes y/o después del desafío con 50 parásitos sanguíneos de la cepa Tulahuen, animales de 8 semanas de edad de las cepas BALB/c o C57BL/6 fueron inoculados utilizando diferentes dosis, esquemas y vías de inoculación con:

- a) interleuquina 2 recombinante humana
- b) interleuquina 1 recombinante murina

c) interferon alfa beta murino

d)interferon gamma recombinante murino

Los materiales se diluyeron antes de su inoculación en PBS-0.1% BSA y se inocularon intraperitonealmente en un volumen de 0.2 ml. Además se inocularon ademas controles con 0.2 ml de PBS-0.1% BSA. En algunos grupos las linfoquinas se administraron por vía subcutanea, con o sin adyuvante incompleto de Freund.

Se determinó la parasitemia y la mortalidad .

3.25: SEPARACION MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)

Se liofilizaron, reconstituyeron en 2 ml de agua destilada y esterilizaron por filtracion, sobrenadantes de cultivo de 48 horas de células de bazo de ratones (5×10^6 células/ml) al 21 pi. Se separaron los componentes en una cromatografía líquida de alta presión . Para la filtración se utilizó una columna G3000 SLUG (LKB, Bromma, Suecia)(21.5 x 600 mm).El eluyente utilizado fue 0.1 M de fosfato monoácido de sodio y 0.1 M de ClNa. La velocidad de elución fue de 4 ml/minuto y la cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente. Se colectaron 30 fracciones (10ml/fracción), esterilizaron por filtración y se ensayó la capacidad de 100 μ l de cada fracción para inhibir la proliferación de células CTL.L en presencia de una cantidad constante de IL-2 según se describió en la sección 3.18. Se determinó el peso molecular (PM) de las fracciones mediante el uso de proteínas con PM de referencia en la separación.

3.26: METODOS ESTADISTICOS:

Para el análisis de los datos experimentales las siguientes pruebas estadísticas fueron realizadas:

La prueba de Mann-Whitney (238) fue utilizada para determinar diferencias de medias en las lecturas de parasitemia.

La prueba de Fisher exacta o la prueba de Chi cuadrado (239) se utilizó para comparar curvas de mortalidad de diferentes grupos experimentales, o para comparar diferentes poblaciones de células en cuanto a la presencia de marcadores de superficie determinadas por inmunofluorescencia.

La prueba de t de Student (237) fue utilizada para determinar diferencias de en la proliferación o capacidad lítica de diferentes poblaciones de células luego de diferentes tratamientos *in vivo* o *in vitro*.

Se realizó un análisis de la varianza de 1 factor (ANOVA) para comparar las medias de experiencias de hipersensibilidad retardada entre otras.

4: RESULTADOS OBTENIDOS

4.1: ANALISIS DE LA RESISTENCIA ADQUIRIDA POR INMUNIZACION CON ANTIGENOS DEL PARASITO

4.1.1: INMUNOPROTECCION DE RATONES POR INMUNIZACION CON FRACCIONES SUBCELULARES DE TRYPANOSOMA CRUZI

Los animales inmunizados con la fracción subcelular flagelar (F) acompañada de B.pertussis como adyuvante (FBp), se encontraron protegidos frente a un desafío con 50 parásitos sanguíneos de la cepa Tulahuén en términos de mortalidad y parasitemia (Tabla I). La inmunización con F sin adyuvante, o con la fracción subcelular microsomal (Mc) no protegió a los ratones.

La esplenomegalia es una de las características de la infección aguda con Trypanosoma cruzi. Los animales inmunizados con F o con Bp mostraron una significativa disminución del peso del bazo respecto a los controles no inmunizados, a los 21 días post infección. Los animales inmunizados con FBp no presentaron esplenomegalia, siendo el peso del bazo igual al de los animales no infectados (Figura 1).

4.1.2: RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN RATONES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DEL PARASITO

La tabla II muestra los niveles de IgG anti T.cruzi en animales inmunizados con antígenos del parásito, antes y después de la infección con una dosis letal de T.cruzi medidos en un ensayo de ELISA. Antes de la infección los animales inmunizados con FBp mostraron mayores niveles de anticuerpos que los animales inmunizados con F o Mc en ausencia de infección. Después del desafío con T.cruzi, los animales inmunizados con los distintos antígenos mostraron niveles de anticuerpos similares. Sin embargo, los niveles fueron mayores que en los animales no inmunizados pero infectados, o que en los ratones inoculados solamente con el adyuvante e infectados.

4.1.3: RESPUESTA INMUNE CELULAR EN ANIMALES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI ANTES Y DESPUES DEL DESAFIO CON EL PARASITO

Se evaluó la reacción cutánea de ratones BALB/c inmunizados con antígenos de T.cruzi y/o desafiados, inoculando antígeno F, Mc o HT y midiendo el grosor de la almohadilla plantar 48 horas después de la inoculación.

Los animales infectados no mostraron reacción cutánea a los 17 o 30 días después de la infección. En cambio, después de 70 días de infección, tuvieron índices de estimulación significativos (tabla III). Los animales inmunizados con F Bp mostraron índices de estimulación positivos ante F y HT antes y después de la infección.

Animales inmunizados con F o Bp no presentaron reactividad cutánea contra HT o F antes de la infección. Todos los animales presentaron reactividad a los 70 o más días después del desafío frente a HT, pero los animales inmunizados con F-Bp mostraron índices mayores. En cambio, solo los animales inmunizados con F-Bp mostraron reacción cutánea en respuesta a F (Tabla III).

Para descartar que la reactividad observada se debe a una reacción de Arthus, se realizó la transferencia de células de bazo y ganglio de animales inmunizados con F-Bp no infectados, a animales singénicos. Como se ve en la figura 2, los receptores de células de bazo de animales inmunizados con FBp mostraron hipersensibilidad retardada *in vivo*, contra HT inoculado 24 horas después de la transferencia. La transferencia de células de animales inmunizados con F o Bp separadamente no indujo ningún tipo de reacción cutánea después de la inoculación de HT. Así se demuestra que la reacción cutánea observada fue una reacción de hipersensibilidad retardada (Figura 2).

Con el objeto de medir otros parámetros de respuesta inmune celular se utilizó el ensayo de linfoproliferación por incorporación de timidina tritiada a células de bazo en respuesta a antígenos del parásito o a concanavalina A, evaluando así la especificidad y la funcionalidad de las células de bazo.

Se encontró (Figura 3) que en ausencia de infección, solo los animales inmunizados con FBp mostraron reactividad ante la estimulación con HT, coincidiendo con los resultados de hipersensibilidad retardada *in vivo* descriptos. En la fase crónica de infección, animales inmunizados o no mostraron reactividad contra HT.

Para comparar la funcionalidad de células T del bazo de ratones inmunizados o no a los 17 días después del desafío, se midió la respuesta a ConA. Células de animales inmunizados con FBp mostraron una respuesta al mitógeno similar a la de animales no infectados, mientras que los esplenocitos de animales no protegidos por la administración de FBp mostraron una supresión de la respuesta a ConA al 17 dpi (Figura 4).

Las células de bazo de animales crónicamente infectados, inmunizados o no, respondieron a Con A en forma similar a los controles no infectados.

4.1.4: TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA A LA INFECCION POR TRYPANOSOMA CRUZI POR CELULAS LINFOIDES O SUERO DE ANIMALES INMUNIZADOS CON FBp O CRONICAMENTE INFECTADOS

Se analizó entonces si células linfoides o suero de animales inmunizados con FBp o crónicamente infectados eran capaces de transferir a receptores singeneicos vírgenes resistencia a la infección.

La transferencia de 0.4 ml de suero de animales crónicamente infectados (0.2ml 2 h antes y 0.2 ml tres días después de la infección) redujo la parasitemia y mortalidad de los ratones tratados (Tabla IV). Un efecto similar se observó al inocular 0.2ml de suero de ratones crónicamente infectados 2h antes de la infección. En cambio la transferencia de este suero 3 días después de la infección no protegió a los ratones de la infección por T.cruzi (Tabla IV).

El suero de animales inmunizados con F-Bp no produjo efecto alguno en los parámetros medidos en comparación con los controles

tratados con suero no inmune, a pesar de que dichos sueros presentaban mayores títulos de anticuerpos anti T.cruzi que los de animales crónicos (Tabla V).

Las células de bazo y ganglio de animales inmunizados con FBp transfirieron la capacidad de disminuir los niveles de parasitemia (Figura 5), aunque los niveles de mortalidad fueron similares a los de los controles de infección o transferidos con células de ratones normales (Figura 5).

Células de bazo y ganglio de animales crónicamente infectados, transfirieron protección al desafío con el parásito, en términos de mortalidad y parasitemia al administrarse por vía endovenosa o intraperitoneal 1 día antes del desafío. La resistencia pudo ser transferida por $25 \cdot 10^6$ células de ratones crónicamente infectados, pero no con 10^6 células (tabla VI). Al inactivar las células por congelamiento y descongelamiento se perdió la capacidad de transferencia de resistencia (Tabla VI), indicando que la resistencia conferida no se debe a la inmunización por antígenos del parásito presentes en la suspensión celular transferida.

Las células de ratones crónicamente infectados fueron capaces de transferir resistencia, cuando se las deplecionó parcialmente de células adherentes por pasaje a través de una columna de Sephadex G-10, indicando que los macrófagos no serían las únicas células capaces de mediar resistencia (Tabla VII). La depleción de gran parte de las células B por adherencia a lana de nylon o por incubación en placas cubiertas por anticuerpos anti IgG de ratón, tampoco eliminó la capacidad de conferir protección por transferencia. Los bajos números de células B transferidos luego de los distintos tratamientos indica que las células T son capaces

por sí mismas, de transferir la resistencia a la infección (Tabla VII). Así, una suspensión total de células de animales crónicamente infectados que contiene la cantidad de células B presente luego de la adherencia a lana de nylon (7×10^6 células) o de la adsorción a placas cubiertas con anti IgG (4.5×10^6 células) es incapaz de transferir resistencia a la infección por el parásito.

Estudios realizados por eliminación de células T o subpoblaciones de las mismas por incubación con anticuerpo contra los marcadores específicos Thy1.2, Lyt1.2 y Lyt2.2 y complemento, indican que por la depleción de estas células, la capacidad de transferir resistencia no se pierde, es decir que poblaciones celulares no T también transfieren resistencia a la infección (Tabla VIII). Sin embargo se observó que la depleción de células T disminuye la capacidad de transferir resistencia en términos de parasitemia (Tabla VIII). Este efecto no pudo ser observado con la eliminación de las células T colaboradoras o T citotóxicas (Tabla VIII).

4.2: PAPEL DE DISTINTAS SUBPOBLACIONES CELULARES LINFOIDES EN LA RESISTENCIA NATURAL A LA INFECCION EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI.

4.2.1: DEPLECION DE SUBPOBLACIONES CELULARES LINFOIDES POR TRATAMIENTO *IN VIVO* CON DIFERENTES ANTICUERPOS CONTRA MARCADORES DE LAS MISMAS.

Con el objeto de estudiar la resistencia natural del ratón a la infección con T.cruzi, se utilizó un modelo de depleción *in vivo* por administración de anticuerpos contra marcadores de subpoblaciones de células T y NK murinas.

Se logró la depleción de células T colaboradoras mediante la administración *in vivo* del anticuerpo monoclonal anti L3T4-GK15. La inoculación *iv* o *ip* del anticuerpo anti L3T4 GK-15 en animales BALB/c tres días antes de la inmunización con glóbulos rojos de carnero (GRC) inhibió totalmente la producción de anticuerpos IgG e IgM medido por el ensayo de células formadoras de placas (Figura 6). El GRC es un clásico antígeno timo dependiente.

El tratamiento *in vivo* de otro grupo de ratones BALB/c con anti Thy 1.2 resultó en una significativa disminución de la respuesta a ConA de las células de bazo en comparación con los grupos controles (Tabla IX). Sin embargo este tratamiento no eliminó completamente la respuesta proliferativa a ConA indicando que alguna (s) subpoblaciones de células T no fueron deplecionadas por este tratamiento (Tabla IX).

Tres días después del tratamiento de ratones BALB/c o C57Bl/6 con anti asialo GM-1 las células de bazo de los mismos no

mostraron actividad NK medida contra células de la línea YAC-1 (Tabla X y XI).

La eliminación de la actividad NK también se obtuvo en animales de la cepa C57BL/6 tres días después de la administración del anticuerpo monoclonal NK1.1 (Tabla XI). Además luego de estimular las células de bazo de ratones BALB/c con interferon α - β durante dos horas, no se observó presencia de actividad NK en animales tratados con anti asialo GM-1. En cambio esta actividad fue significativamente aumentada al estimularse células de animales controles (Tabla X B). Dado que NK 1.1. es un marcador alotípico presente en células NK de animales de la cepa C57BL/6, animales de otras cepas no fueron tratados con anti NK-1.1. Este marcador es más exclusivo de células con actividad NK que el antisuero anti asialo-GM1.

4.2.2: RESISTENCIA A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI EN RATONES DEPLECIONADOS DE CELULAS T , T COLABORADORAS Y NK.

Grupos de ratones de la cepa BALB/c y C57BL/6 fueron inoculados con anti L3T4, anti Thy 1.2, anti asialo GM-1, o suero normal de rata, e infectados experimentalmente tres días después con 20 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen. Un grupo de animales de la cepa C57BL/6, fueron tratados con anticuerpos monoclonales anti NK1.1.

Los ratones tratados con los anticuerpos y deplecionados de las distintas suboblaciones celulares, tanto de la cepa BALB/c (Figura 7A) como de la C57BL/6 (Figura 7B) mostraron a lo largo de la infección mayores parasitemias que los controles. La depleción *in vivo* de células NK y T colaboradoras resultó en un aumento de

la susceptibilidad a la infección en términos de mortalidad (Figura 8 A y B) en ambas cepas de ratones. Los animales tratados con suero normal de rata no mostraron diferencias en la resistencia a la infección con respecto a controles no tratados.

Las infecciones se llevaron a cabo utilizando parásitos mantenidos por pasajes en la cepa BALB/c. Se debe así descartar la posibilidad de una activación de células NK mediada por reconocimiento alogeneico.

4.2.3: PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI TRYPANOSOMA CRUZI EN ANIMALES DEPLECIONADOS DE CELULAS T COLABORADORAS POR TRATAMIENTO **IN VIVO** CON ANTI L3T4.

Con el objeto de analizar si la producción de anticuerpos anti T.cruzi es dependiente de células T colaboradoras, se trataron ratones con anticuerpos anti L3T4. Tres días más tarde los ratones se inmunizaron con tripomastigotes de cultivo de fibroblastos murinos de la línea L-929 muertos por calentamiento. El mismo procedimiento (el tratamiento con anti-L3T4 y la inmunización con tripomastigotes inactivados) se repitió 10 y 25 días después de la inmunización primaria.

Los anticuerpos anti T.cruzi fueron medidos por el ensayo de ELISA en el suero obtenido 4 días después de la última inmunización. El suero de animales inmunizados con T.cruzi presentó anticuerpos específicos (Figura 9), mientras que los animales tratados con anti L3T4 e inmunizados no produjeron anticuerpos contra la forma epimastigote del parásito (Figura 9).

4.3: MODULACION DE LA PRODUCCION Y RESPUESTA A LINFOQUINAS Y FACTORES SOLUBLES DURANTE LA INFECCION EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI Y ANALISIS DE ESTOS FACTORES EN EL MARCO DE LA RESISTENCIA A LA INFECCION EXPERIMENTAL CON EL PARASITO.

4.3.1: PRODUCCION DE IL-2 Y EXPRESION DE SU RECEPTOR DURANTE LA FASE DE ACTIVACION POLICLONAL INDUCIDA POR LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI.

Al cultivar células de bazo obtenidas a los 4 a 7 días después de la infección, se observó una aumentada síntesis de ADN, que retorna a valores normales 14 días después de la infección (Figura 10).

Se observó que la producción de IL-2 por los esplenocitos de estos animales, medida por la proliferación de células de la línea CTL.L dependiente de IL-2, sin el agregado de antígeno o mitógeno al cultivo, correlaciona con esta proliferación espontánea (Figura 10).

Para analizar si la producción de IL-2 observada dependía de la dosis infectiva, grupos de animales se infectaron con diferentes números de T.cruzi. En la figura 11 se observa que la producción de IL-2 al día 4 (Figura 11 A) u 8 (Figura 11 B) varía con la dosis infectiva utilizada. Animales infectados con 1 parásito a los 4 dpi, mostraron mayor producción de IL-2 que animales infectados con $5 \cdot 10^1$ o $2 \cdot 10^4$ parásitos, en los que también se detectó IL-2 en los sobrenadantes. Al día 8 pi no se detectó producción de IL-2 en animales infectados con $2 \cdot 10^4$ parásitos. En cambio la linfoquina fue detectada en sobrenadantes

de células de bazo de animales infectados con 1 o 50 parásitos (50 parásitos es aproximadamente una dosis letal 50).

Se debe aclarar que las dosis infectivas se indican como el número de tripomastigotes, bajo el criterio parasitológico de contar en cámara de Neubauer. La presencia de antígenos del parásito en el inóculo podría producir las alteraciones determinadas.

Con el objeto de caracterizar fenotípicamente las células responsables de la producción de IL-2, se trataron las suspensiones celulares con anticuerpos contra diferentes marcadores de superficie de células linfoides y complemento.

El tratamiento de células de bazo de animales infectados al 4 dpi con anticuerpos anti Thy 1.2 o con anti Lyt 1.2 y complemento, antes del cultivo, resultó en la eliminación de la síntesis de IL-2 (Figura 12). En cambio la depleción de células Lyt 2.2 positivas por el mismo tratamiento, no condujo a la falta de producción de la linfoquina (Figura 12). Para deplecionar en células adherentes, las células de bazo se incubaron en superficies de plástico durante 90 min a 37 C, las células no adheridas se lavaron cuidadosamente y el procedimiento de deplación fue repetido. Células de bazo así tratadas, liberaron IL-2 al sobrenadante de cultivo de 48 h, aunque en menores niveles que en la población no fraccionada (Figura 12).

La expresión del receptor de IL-2 en células de bazo de animales infectados al 4 pi se determinó por un método radiométrico, usando ^{125}I -rec-IL-2. Las células de bazo de animales infectados con $1 \cdot 10^0$, $5 \cdot 10^1$ o $2 \cdot 10^4$ parásitos, mostraron, luego del cultivo por 48 h, expresión del receptor de IL-2 (Tabla

XII). La depleción de células lny 1.2 positivas antes del cultivo utilizando el anticuerpo monoclonal respectivo y complemento resultó en la falta de expresión del receptor en la población (Tabla XIII). En cambio la depleción de células Lyt 2.6 positivas no produjo alteraciones en la expresión del receptor (Tabla XIII). Es decir que la expresión de este receptor depende de la presencia de células T, Lyt2.2 negativas.

4.3.2: MODULACION DEL SISTEMA IL-2 DURANTE LA ETAPA TARDIA DE LA FASE AGUDA DE LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

El objetivo subsiguiente fue analizar la funcionalidad de los mecanismos mediadores de respuesta inmune, y en especial del sistema IL-2 durante la fase aguda de la infección con el parásito, y en respuesta a estímulos inespecíficos.

En la tabla XIV se observa la cinética de respuesta proliferativa de células de bazo a ConA, durante la infección con T.cruzi. Se observa una profunda inhibición de dicha respuesta, entre la segunda y la cuarta semana pi. Esta depresión alcanza máximos niveles alrededor de la tercera semana después de la infección. La respuesta proliferativa esta parcialmente restaurada en fases tardías de la infección.

La producción de IL-2 en respuesta a ConA por células de bazo también se mostró significativamente inhibida a lo largo de la fase aguda de la infección con el parásito (Tabla XV). Dicha inhibición también fue máxima en la tercera semana post infección (alrededor de un 5% de los niveles de linfoquina sintetizados por células de bazo de animales controles) (Tabla XV).

Se observó una restauración parcial en la capacidad de producción de IL-2 en la fase crónica de infección (60 dpi). En esta etapa de la infección se observó que células de bazo producían IL-2 y proliferaban al ser estimuladas con un homogenato total de tripomastigotes de cultivo (Tabla XVI), es decir eran capaces de responder a un estímulo específico sintetizando IL-2.

Para tratar de explicar la falta de respuesta a Con A durante la etapa tardía de la fase aguda de la infección del ratón, se midió la expresión del receptor de interleuquina 2 inducida por Con A sobre células de bazo de ratones al 21 dpi y a diferentes tiempos de cultivo. Los resultados se obtuvieron por medio de un analizador de células activado por fluorescencia (FACS). Esplenocitos de animales controles o infectados al 21 dpi estimulados con Con A (48h), fueron tratados con anticuerpo anti el receptor de IL-2 murino (7D4). Estos ensayos mostraron que la infección por T.cruzi afecta expresión del receptor de IL-2 en la población estimulada (Figura 13).

También se demostró una reducción en la capacidad de expresar IL-2R por células de bazo de ratones al 21 dpi en comparación con ratones no infectados luego de 18 o 72 horas de cultivo en presencia de ConA (datos no presentados).

Al analizar el fenotipo de las células infectadas luego de la estimulación con ConA, utilizando diferentes marcadores, se observó que la relación entre las distintas subpoblaciones de células linfoides era similar en ratones infectados o controles (Tabla XVII). Es decir que la deficiencia en la expresión del receptor de IL-2 no se debió a la eliminación de células T en los

esión de los receptores de IL-2, se realizaron (binding) utilizando interleuquina 2 marcada 48 horas después de la estimulación con ConA. A partir de ensayos de competencia con ligando no se realizó el análisis de Scatchard de los mismos. Se observó en algunos casos la depleción de receptores de alta afinidad y menores números del receptor de alta afinidad (Tabla XVIII). Estos últimos conservan la afinidad (Tabla XVIII). (Figura 14, tabla XVIII).

En la figura presentada, la pendiente de la curva es proporcional a la afinidad del ligando por el receptor. Se observó la presencia de dos curvas, que representan receptores de diferente afinidad. Estos se evidencian al variar la concentración del ligando frío. El punto donde la extrapolación de la curva a la abscisa es proporcional al número de receptores por superficie celular.

En 3 de 6 ensayos realizados con blastos de ConA durante 48 horas de estimulación, se observó la completa depleción de los receptores de IL-2.

Para confirmar estos datos en un ensayo biológico se realizó una respuesta proliferativa a IL-2 recombinante de células animales infectados (3 semanas de infección) estimuladas por ConA durante 48 horas. En la tabla XI se muestra la menor capacidad de respuesta a IL-2 de blastos de células animales infectados respecto a los provenientes

controles. A pesar de ello la respuesta a IL-2 no se mostró completamente eliminada en células provenientes de animales infectados.

4.3.3: CELULAS DE BAZO DE ANIMALES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI PRODUCEN FACTORES SOLUBLES QUE INHIBEN LA PROLIFERACION CELULAR

Con el objeto de analizar otros mecanismos que pudieran justificar la inhibición de la respuesta a ConA y la inmunodepresión observada en la fase aguda, se analizó la capacidad de sobrenadantes de cultivos de 48 horas de inhibir la respuesta proliferativa dependiente de la presencia de IL-2 de células de la línea CTL.L. Se observó inhibición de esta respuesta por sobrenadantes (48h) de células del bazo (5×10^6 /ml) de ratones a las 2, 3 y 4 semanas después de la infección (Figura 15). En la figura 16 se muestra que los factores presentes en los sobrenadantes de los cultivos de células de animales infectados al 21 dpi no compitieron con 125 I-IL-2 por el receptor de interleuquina 2 de células de la línea CTL.L. Los controles realizados con interleuquina 2 fría mostraron dicha competencia. Esto indica que los factores solubles supresores no se unen al sitio de unión a la interleuquina 2 al receptor.

Se analizó entonces la posibilidad de que dichos sobrenadantes actúen en forma independiente de IL-2. Para ello se los incubó con células de diferentes líneas durante 24 horas, midiendo entonces la capacidad proliferativa por incorporación de 3 -timidina tritiada. Se observó que los sobrenadantes suprimieron

la proliferación de células X-63, Raji y Molt, pero no inhibieron la de células sp-20 o W/Fu, al compararlos con sobrenadantes de células de bazo de animales no infectados (Figura 17).

Así se descartó que estos factores solubles actúen por vía del sistema IL-2, así como también la posibilidad de un efecto tóxico generalizado.

Para caracterizar físicamente a estos sobrenadantes, se los concentró y separó por peso molecular en una columna de HPLC. Se probó la capacidad de las fracciones recogidas para inhibir la proliferación de células de la línea CTL.L en presencia de una cantidad constante de IL-2 (Figura 18). Se observó que existen dos picos de inhibición de la proliferación, correspondiendo a moléculas de 50 y 150 Kd (Figura 18). Experimentos preliminares mostraron que la proteína de 150 Kd no tiene la capacidad de unirse a proteína A, sugiriendo que no se trata de una inmunoglobulina.

Diferentes grupos de trabajo han demostrado la capacidad de factores presentes en el suero murino de inhibir la proliferación de células CTL.L dependientes de IL-2 (82).

En la figura 19 se confirma la capacidad de dichos sueros de inhibir la proliferación de células CTL.L. Se observa además que

4.3.4: EFECTO DE LA ADMINISTRACION IN VIVO DE INTERLEUQUINA 2, INTERFERON- τ E INTERFERON α - β EN LA RESISTENCIA A LA INFECCION POR TRYPANOSOMA CRUZI.

Con el objeto de evaluar la significación *in vivo*, y en el contexto de la resistencia a la infección, de los defectos en la producción de IL-2 y en la expresión del receptor de linfoquina observados *in vitro*, se administró interleuquina 1, τ interferón e interferón α - β en animales. Se estudió el efecto de dicha administración en la resistencia de ratones a la infección experimental por T.cruzi.

La inoculación intraperitoneal (ip) de ratones BALB/c con interleuquina 1 (1 μ g/dosis-ratón) o interleuquina 2 (10⁶ U/dosis-ratón), no indujo actividad protectora, en términos de parasitemia o mortalidad (Figura 20). Se observaron resultados similares cuando la IL-2 se administró a ratones C57BL/6 en forma subcutánea, con o sin adyuvante incompleto de Freund (XX).

En contraste con la falta de efecto en la resistencia a la infección dado por la inoculación de IL-1 o IL-2, el tratamiento con interferón τ aumentó la resistencia de los animales a la infección en forma dosis dependiente (Figura 21). La administración ip, día por día a partir del día anterior a la infección hasta el día 13 dpi, de 10⁶ dosis de interferón murino, dosis capaz de inducir la activación de macrófagos *vivo* (160), resultó en un descenso de la parasitemia y un aumento de la supervivencia de los ratones tratados en comparación con

controles. Dicho efecto no se observó cuando los animales se trataron con 2500 U/dosis-ratón (Figura 21).

La inoculación de una sola dosis de 10^5 U, un día antes de la infección de interferón γ , también produjo un descenso en parasitemia y mortalidad de los animales tratados (tabla XXI).

Por otro lado la administración de interferón α - β en dosis de 2500 U/ratón, día por día desde el día anterior al 13 después de la infección también disminuyó la susceptibilidad de los animales a la infección (Tabla XXII). El tratamiento con interferón α - β desde el día 5 al día 13 después de la infección fue inefectivo, mientras que cuando se lo administró los días -1, 0.1 y 3, resultó en un aumento en la resistencia de los animales en términos de parasitemia.

4.3.5: RELACION ENTRE LA INMUNODEPRESION Y LA ACTIVIDAD DE PROSTAGLANDINAS

Diferentes grupos de trabajos han propuesto que la actividad de células adherentes es parcialmente responsable de los fenómenos de inmunodepresión observados en la infección experimental con Trypanosoma cruzi. Por otro lado, ha sido demostrada la modulación que diferentes prostaglandinas ejercen sobre el sistema IL-2.

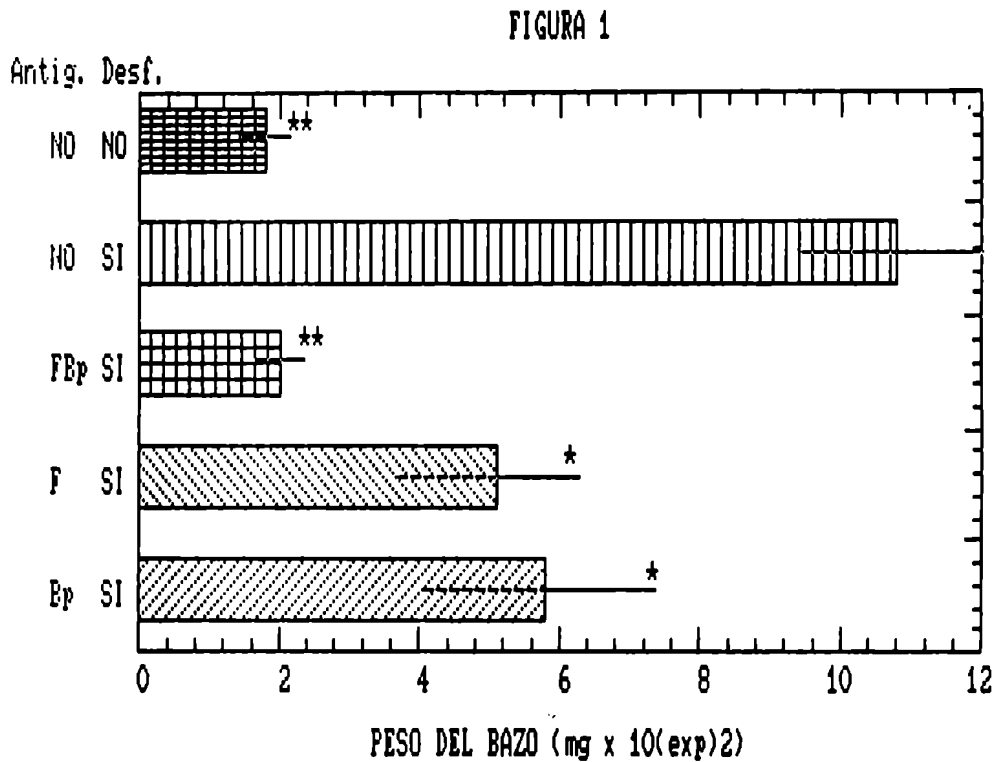
Se estudió el papel de las prostaglandinas en la inhibición de la respuesta proliferativa a ConA y en la producción de factores supresores. Para ello se trataron *in vitro* cultivos de células provenientes de animales infectados (21 dpi) y normales estimuladas con ConA con dosis de indometacina capaces de inhibir la vía de la lipooxigenasa del ácido araquidónico. El tratamiento

con indometacina no produjo una restauración de la respuesta a ConA de células de bazo provenientes de ratones infectados (Tabla XXIII). La incorporación de ^3H -timidina fue similar a la de los cultivos de células de animales infectados, no tratados con indometacina. El agregado de indometacina no modificó los niveles de proliferación de las células provenientes de animales no infectados, luego de la estimulación con ConA (Tabla XXIII).

Para descartar la actividad de prostaglandinas en el efecto inhibitorio de la proliferación celular de sobrenadantes de esplenocitos de ratones infectados, se agregó indometacina al cultivo (48h) de células de bazo de animales infectados al 21 dpi y controles. Los sobrenadantes cosechados provenientes de cultivos en los que se había agregado el inhibidor no mostraron una disminución en su capacidad de inhibir la proliferación de la línea celular P-815 (Tabla XXIV), es decir que la producción de factores inhibitorios no estaría relacionada con la actividad de prostaglandinas.

FIGURA 1

PESO DEL BAZO DE ANIMALES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* Y/O DESAFIADOS CON EL PARASITO.

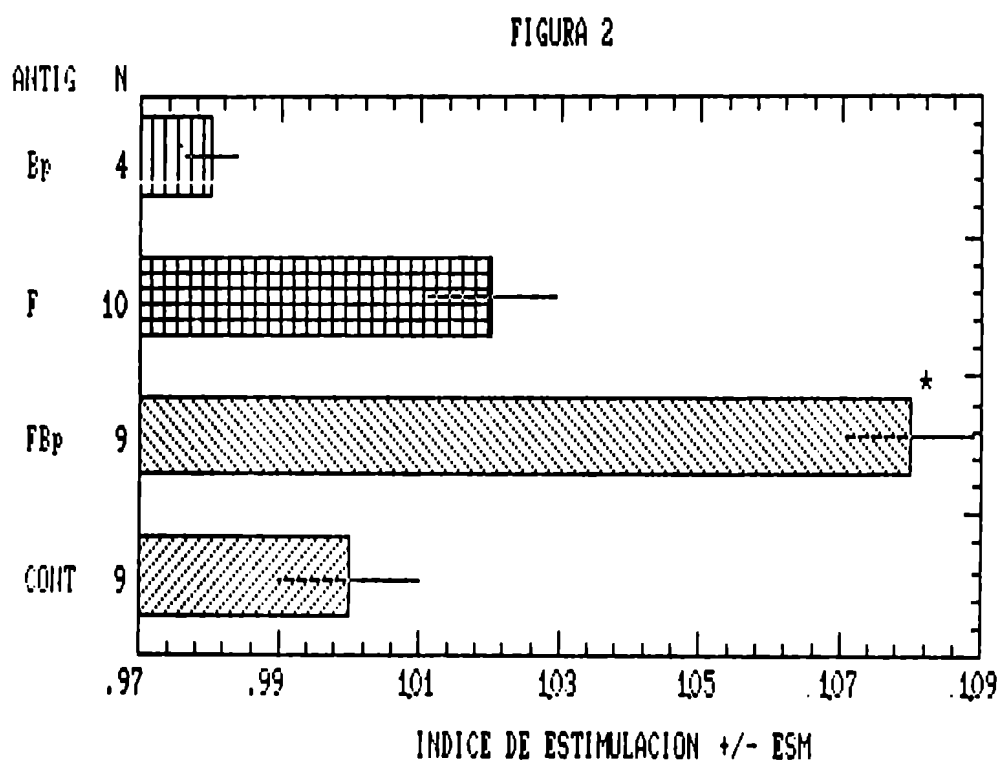


Se inmunizaron ratones BALB/c con fracciones subcelulares de *T. cruzi* según se describió en la sección 3.4, y se los desafió con 50 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén un mes después de la última dosis de inmunógeno. Los animales fueron sacrificados 20-25 días después del desafío.

Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (ESH) del peso del bazo. Las diferencias significativas con respecto a animales infectados no inmunizados se presentan como: * p \leq 0.05, **p \leq 0.005 (prueba t de Student)

FIGURA 2

TRANSFERENCIA PASIVA DE REACCION CUTANEA POR CELULAS DE ANIMALES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI



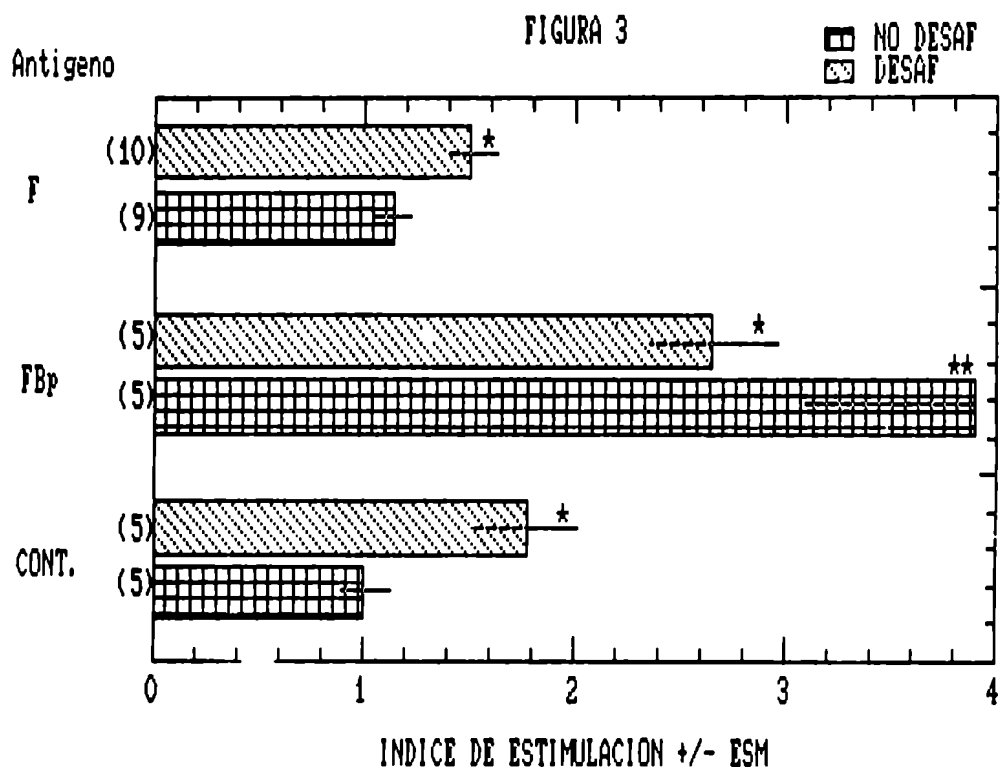
Se obtuvieron células de bazo de ratones inmunizados controles 4 semanas después de la última dosis de antígeno.

Se realizó la reacción cutánea 24 horas después de la transferencia iv de 10^9 células de bazo a receptores singéneos, utilizando homogenato total del parásito (50 µg/ratón) como antígeno.

Los datos se presentan como índice de estimulación \pm ESM. En paréntesis: número de ratones. Las diferencias son significativas con respecto a los controles * ($p < 0.05$ prueba de Mann-Whitney de diferencias de medias).

FIGURA 3

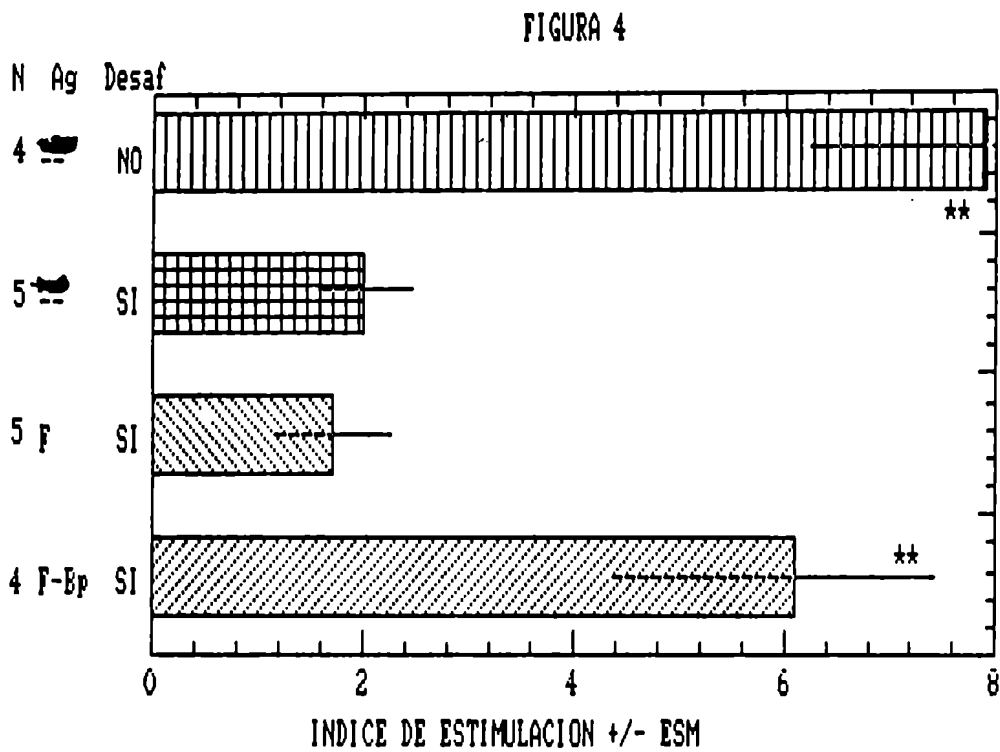
RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA A TRYPANOSOMA CRUZI POR CELULAS DE BAZO DE ANIMALES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DEL PARASITO .



Ratones inmunizados como se describió en la tabla I y controles no inmunizados se sacrificaron antes o 85-120 días después del desafío con 50 tripomastigotes sanguíneos. Se ensayó la respuesta proliferativa frente a HT de T. cruzi según descrito en la sección 3.11. En paréntesis : número de ratones. Los controles no estimulados incorporaron aproximadamente 2000 dpm de [³H]-timidina . Diferencias estadísticamente significativas respecto a controles no inmunizados y no infectados se presentan como *(p<0.05) y **(p<0.001) (t de Student). Las diferencias entre animales inmunizados y los no inmunizados después del desafío no son significativas.

FIGURA 4

RESPUESTA PROLIFERATIVA A CON A DE CELULAS DE BAZO DE ANIMALES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI Y DESAFIADOS

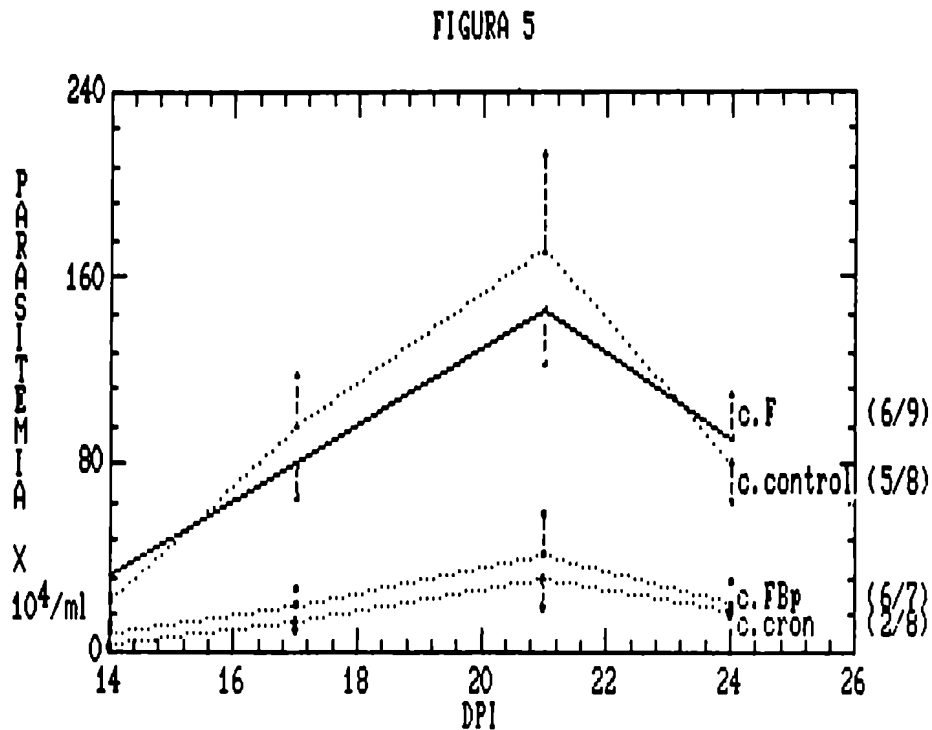


Ratones inmunizados como se describió en la tabla I se sacrificaron 20-25 días después del desafío con 50 tripomastigotes sanguíneos. Se ensayó la respuesta proliferativa a ConA 10 µg/ml según se describió en la sección 3.11.

Los controles no estimulados incorporaron alrededor de 3000 cpm. En parentesis : número de ratones. Las diferencias con respecto al control infectado son significativas **: $p < 0.01$ (t de Student).

FIGURA 5

TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI
 POR CELULAS DE RATONES CRONICAMENTE INFECTADOS Y/O INMUNIZADOS.

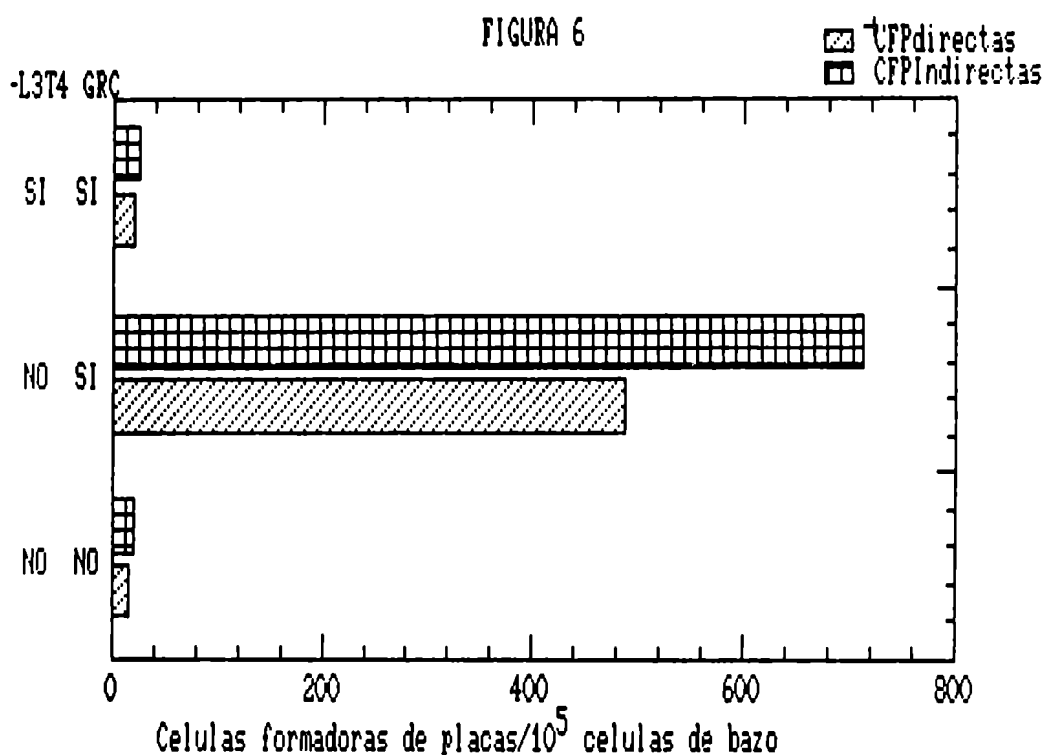


Se transfirieron iv 10^6 células de ratones normales, inmunizados con F, F-Bp, o de ratones crónicamente infectados. Los ratones fueron desafiados con 50 parásitos Tulahuen 24 horas después de la transferencia. Seis de 11 ratones transferidos con células de animales crónicamente infectados no presentaron parasitemia. Se indican las medias de las parasitemias determinadas \pm ESM. Entre paréntesis se observa la mortalidad acumulada al 40 dpi con respecto al número de animales del grupo.

Las diferencias entre los valores de parasitemia de animales transferidos con células de animales inmunizados o crónicos fueron significativas respecto a los controles $p < 0.01$ y 0.02 respectivamente, prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon .

FIGURA 6

INHIBICION DE LA GENERACION DE ANTICUERPOS CONTRA ERITROCITOS
HETEROLOGOS POR TRATAMIENTO IN VIVO CON ANTI-L3T4



Ratones de la cepa BALB/c fueron tratados con anticuerpo monoclonal anti-L3T4 e inmunizados iv con eritrocitos de carnero (GRC) 3 días después del tratamiento. El tratamiento se repitió a los 10 y 23 días después de la primera dosis de GRC. Los controles fueron inmunizados con GRC sin la administración previa del anticuerpo monoclonal.

Los ratones fueron sacrificados 4 días después de la última dosis de GRC. Se evaluaron duplicados de células formadoras de placas directas e indirectas en el bazo de los mismos, mediante el agregado de antiIgG de ratón en conejo (1/100). Los resultados se expresan como media de células formadoras de placas/10⁵ células de bazo. Las diferencias entre grupos tratados con anti-L3T4 y los controles inmunizados fueron significativas ($p \leq 0.02$ t de Student).

FIGURA 7

EFFECTO DEL TRATAMIENTO IN VIVO CON ANTICUERPOS ANTI-L3T4 Y ANTI-NK SOBRE LA RESISTENCIA A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

FIGURA 7A

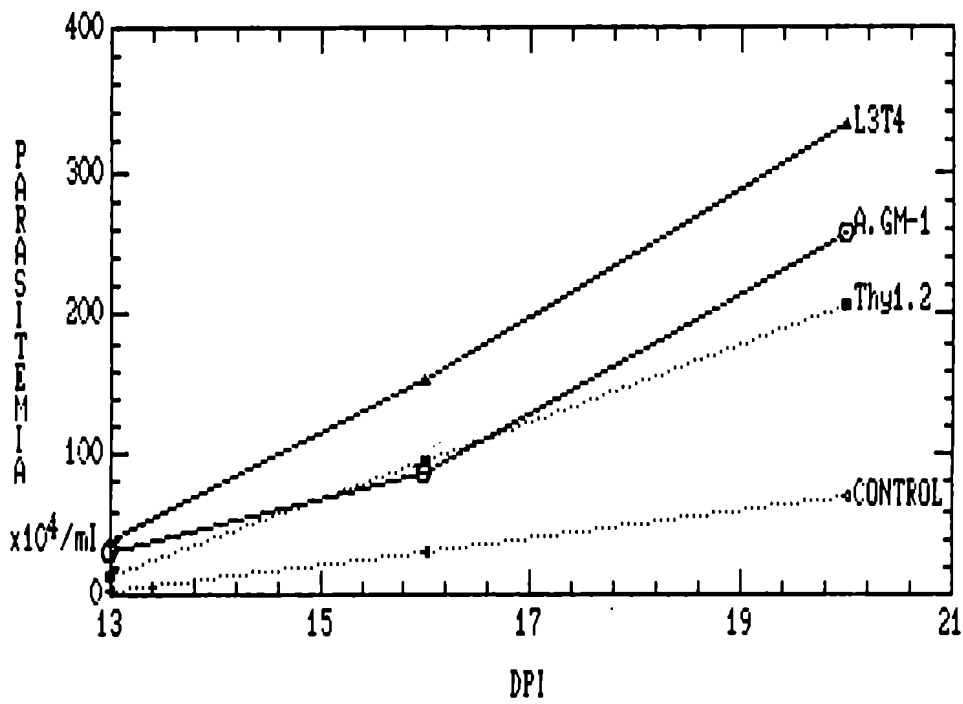
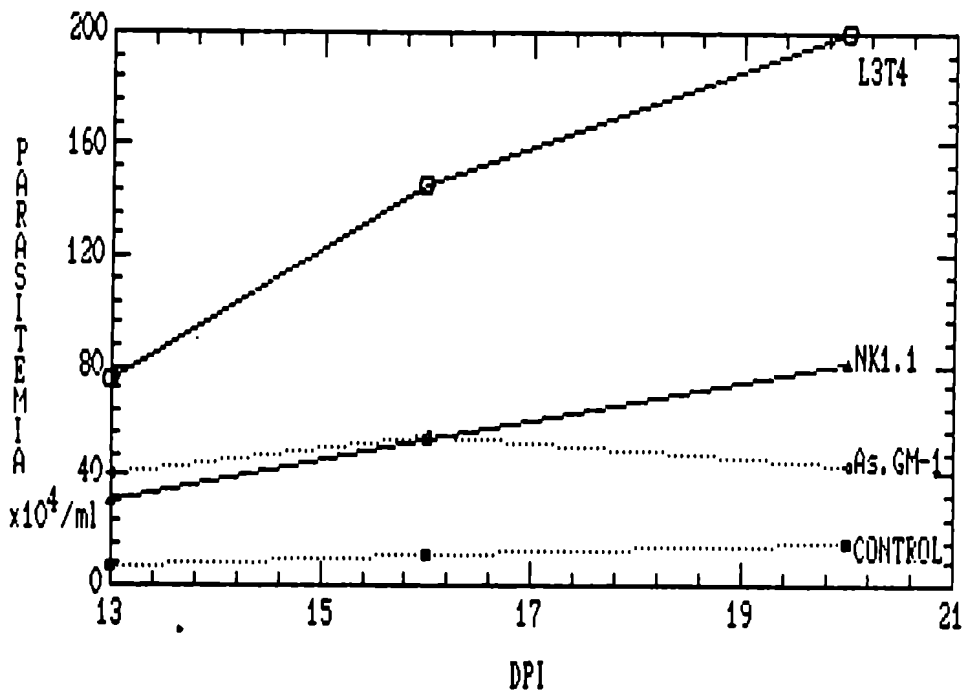


FIGURA 7B



Ratones BALB/c, n=9 (figura 7 A) o C57Bl/6, n=6 (figura 7 B) fueron inoculados con anticuerpo monoclonal anti L3T4 GK 15, anti Thy 1.2, o anti asialo GM-1. Además un grupo de ratones C57Bl/6 fue tratado con anticuerpo monoclonal anti NK 1.1. Los controles fueron inoculados con suero de rata normal. Tres días después del tratamiento con anticuerpo, los ratones fueron inoculados con 20 parásitos de la cepa Tulahuen de T.cruzi. La parasitemia fue determinada periódicamente. Los resultados se expresan como la media de las parasitemias. Las diferencias entre el grupo control y los grupos tratados resultaron significativas en todos los casos ($p < 0.02$ Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon). Ver sección 3.16 para mayores detalles experimentales.

FIGURA B

MORTALIDAD ACUMULADA EN RATONES TRATADOS CON ANTI-L3T4 , ANTI ASIALO GM-1, O ANTI NK 1.1 E INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI.

FIGURA 8 A

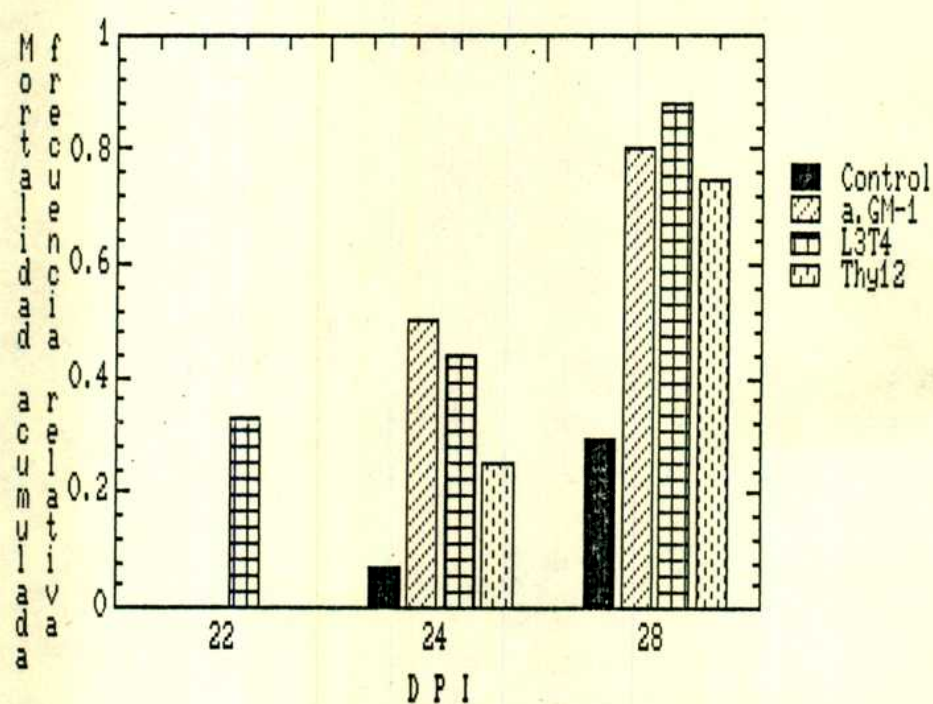
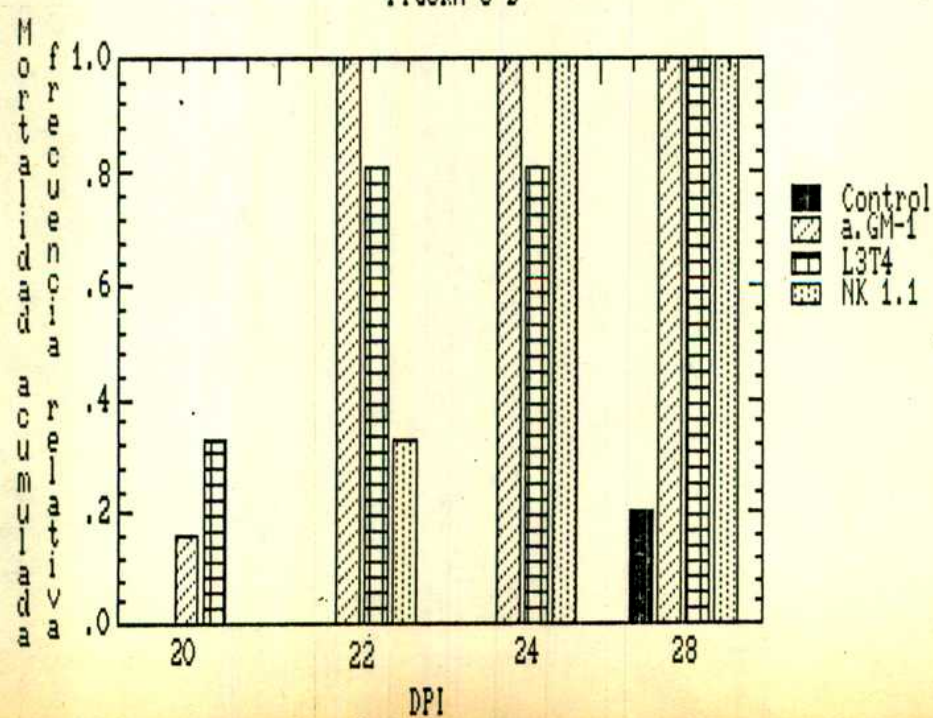


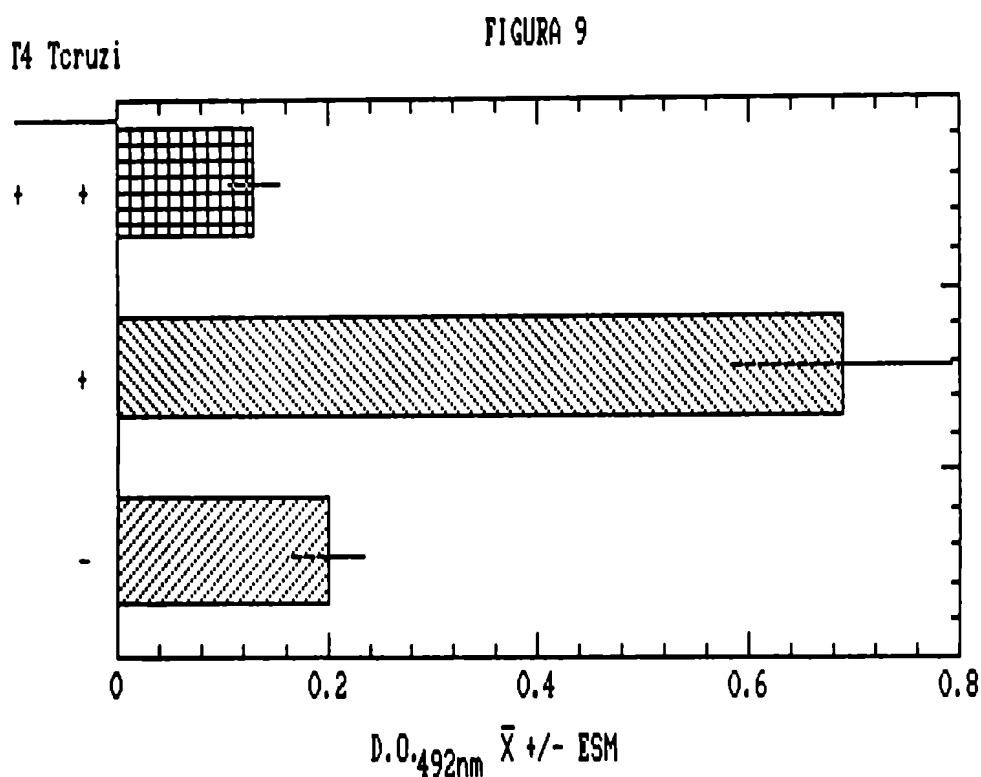
FIGURA 8 B



Ratones BALB/c (figura 8 A) o C57B1/6 (figura 8 B) fueron tratados bajo en la forma descrita en la leyenda de la figura 7, y se registró la mortalidad. Las diferencias entre el control y los grupos tratados fueron significativas ($p < 0.01$, prueba exacta de Fisher) .

FIGURA 9

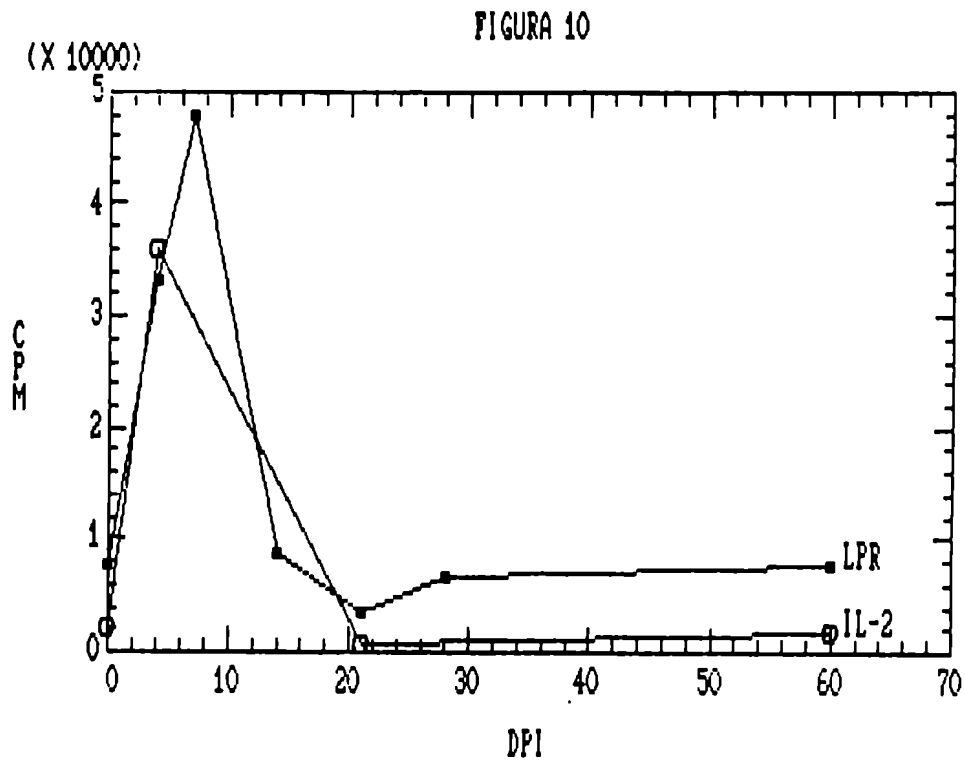
EFEECTO DE LA ADMINISTRACION DE ANTI-L3T4 EN LA GENERACION DE ANTICUERPOS ANTI TRYPANOSOMA-CRUZI



Ratones BALB/c fueron tratados con anticuerpo anti-L3T4 GK.15. Tres días después fueron inmunizados con tripomastigotes muertos por calentamiento. El mismo procedimiento fue repetido a los 10 y 25 días después de la primera inmunización.

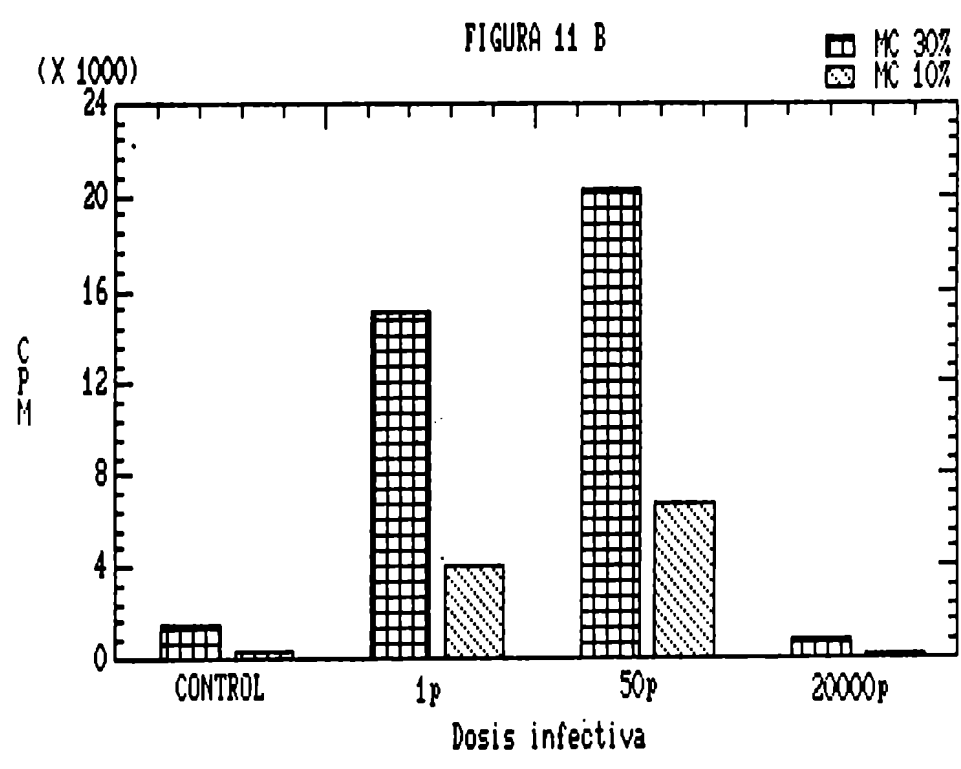
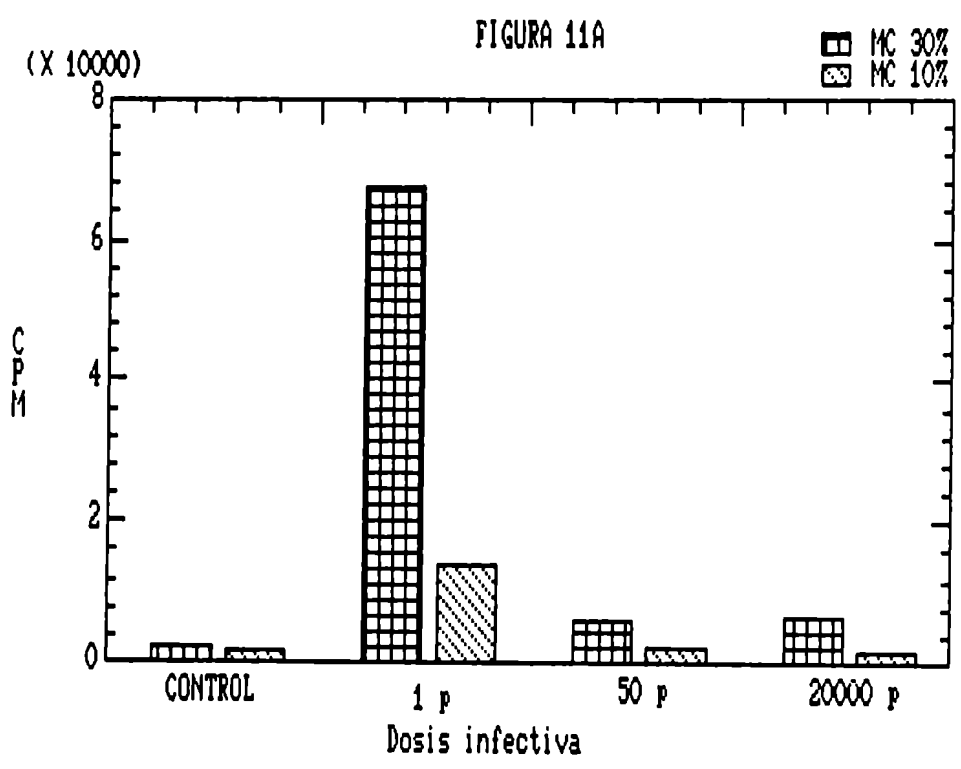
Los ratones fueron sangrados 4 días después de la última dosis de antígeno. Los anticuerpos séricos fueron cuantificados en un ensayo de ELISA utilizando un homogenato total de la forma epimastigote de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* como antígeno. Los resultados se expresan como la media de la absorción de los sueros en cada grupo experimental \pm ESM. Se incluyeron controles inmunizados pero no tratados con anti-L3T4 así como animales vírgenes no inmunizados. Para mayores detalles ver sección 3.6 (materiales y métodos).

FIGURA 10
 CINETICA DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA Y PRODUCCION
 "ESPONTANEA" DE IL-2 DE CELULAS DE BAZO DE RATONES DURANTE LA
 INFECCION POR TRYPANOSOMA CRUZI.



Ratones BALB/c infectados con 50 tripomastigotes sanguíneos de T.cruzi, fueron sacrificados en los días indicados (4 A 7 ratones/grupo) y la proliferación de células de bazo fue medida 72 horas después en cultivos de animales individuales realizados por triplicado. También se obtuvo medio condicionado (MC) y el contenido de IL-2 del mismo fue medido en un ensayo de proliferación de células CTL.L (30% MC agregado). Los resultados se expresan como la media de la incorporación de timidina (cpm) del grupo experimental .
 Control negativo en el ensayo de IL-2 : solo medio de cultivo agregado:267 cpm.
 Ver sección 3.16 para mayores detalles.

FIGURA 11
 VARIACION DE LA PRODUCCION DE IL-2 DURANTE LA INFECCION TEMPRANA
 CON TRYPANOSOMA CRUZI CON LA DOSIS INFECTIVA DEL PARASITO.



Se infectaron ratones BALB/c (n=3) con los números indicados de T.cruzi. Al día 4 y 8 pi (figura 11 A y 11 B respectivamente), se obtuvieron células de bazo de animales individuales y fueron cultivadas por 48 horas. Se obtuvo entonces el MC y la producción de IL-2 fue evaluada en un ensayo con células CTL.L. Los resultados se expresan como la media de la incorporación de ³H-timidina (cpm) de los distintos grupos experimentales.

Control de células de animales no infectados estimuladas con Con A: 202000 cpm

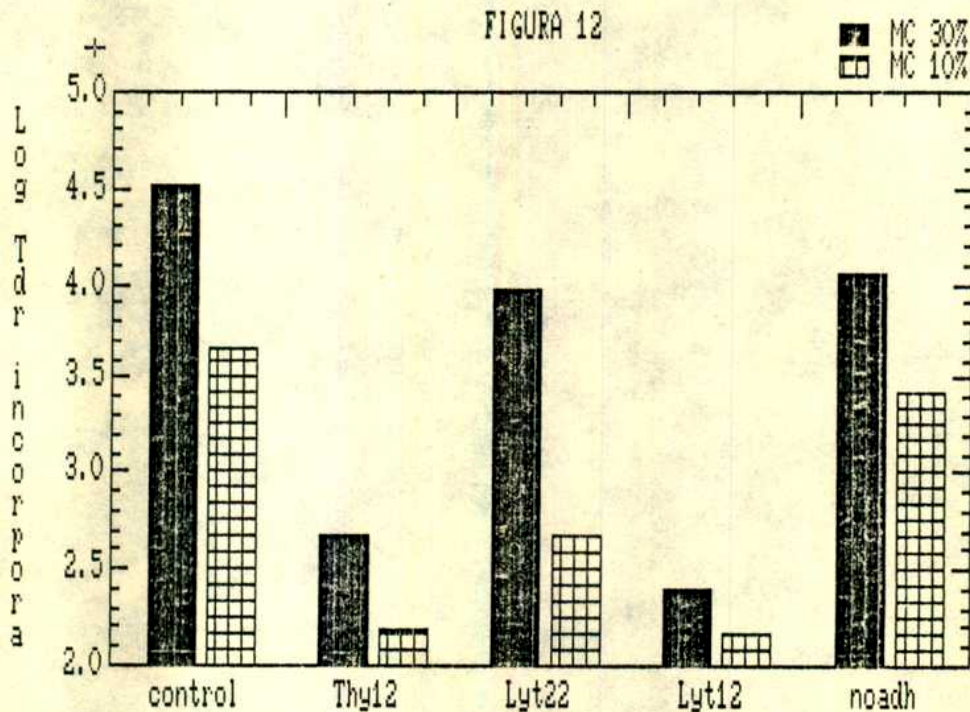
Control de células CTL.L (con medio de cultivo): 604 cpm

Se agregó 30% o 10% de medio condicionado (concentración final) en los cultivos.

Ver sección 3.16 (Materiales y métodos) para mayor detalle experimental.

FIGURA 12

CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LAS CELULAS RESPONSABLES DE LA PRODUCCION DE IL-2 DURANTE LAS ETAPAS TEMPRANAS DE INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI.



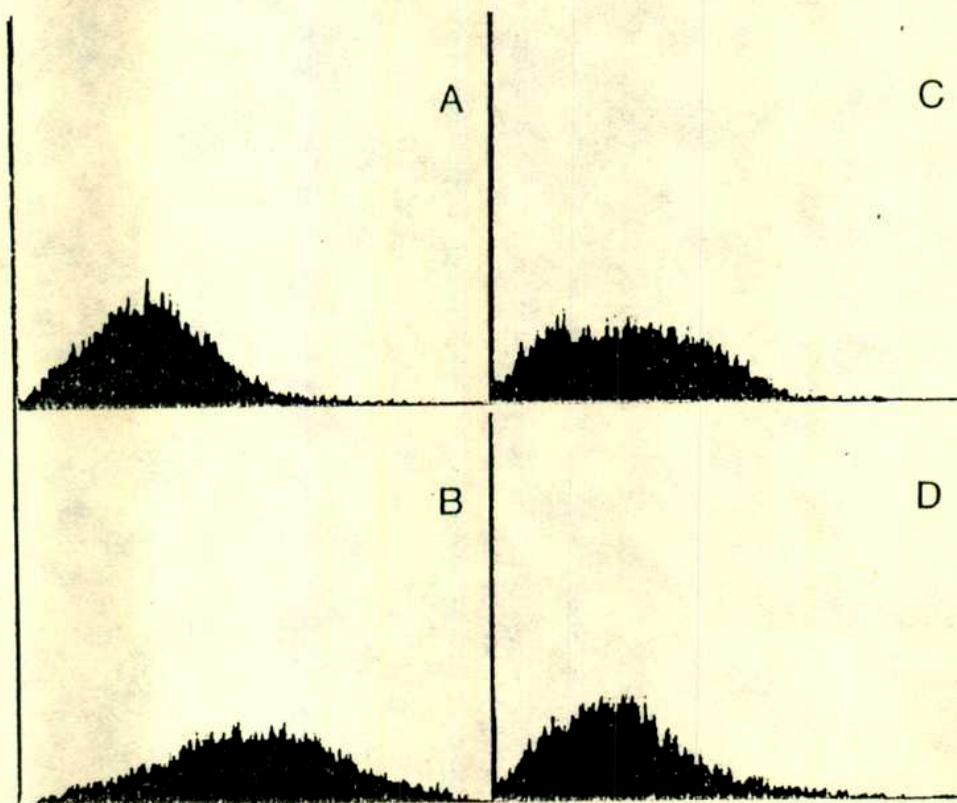
Células de bazo de ratones BALB/c obtenidas al día 4 pi fueron tratadas con anti Thy 1.2, anti Lyt 1.2 o anti Lyt 2.2 por 1 hora a 4°C, lavadas y tratadas con complemento (1 hora a 37°C). La depleción de células adherentes se realizó por incubación de la suspensión de células del bazo (5×10^6 /ml) por 2 horas a 37°C, en frascos de cultivo de poliestireno. Las células no adheridas fueron cosechadas cuidadosamente e incubadas por otras 2 horas a 37°C.

Después de los tratamientos, las células fueron lavadas y cultivadas por 48h. Se obtuvo el medio condicionado, y se midió el contenido de IL-2 del mismo en un ensayo de células CTL.L. Los resultados se expresan como la media de incorporación de radiactivo.

Para mayor detalle experimental ver sección 3.16.

FIGURA 13

EXPRESION DEL RECEPTOR DE IL-2 POR CELULAS DE RATONES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI AL 21 DPI



Se cultivaron células de bazo (5×10^6 células/ml) de ratones infectados al 21 dpi (Figura 13 C y D) y normales (Figura 13 A y B) por 48 horas en presencia de ConA ($10 \mu\text{g/ml}$).

Las células fueron teñidas con anticuerpo monoclonal anti receptor IL-2 biotinilado (7D4) y streptoavidina FITC (Figuras 13 B y D). Las figuras 13 A y C muestran perfiles de FACS de células de bazo de ratones controles (13 A) o infectados (13 C) a las que se adicionó streptoavidina-FITC solamente. El número relativo de células se indica sobre las ordenadas (se midieron 10^4 células). El valor de las abscisas representa el logaritmo de la intensidad de fluorescencia. Ver la sección 3.7 para mayores detalles experimentales.

FIGURA 14

ANALISIS DE SCATCHARD DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR DE IL-2 SOBRE
CELULAS DE BAZO DE BALB/c NORMALES O INFECTADOS 21 DPI
ESTIMULADAS CON CON A

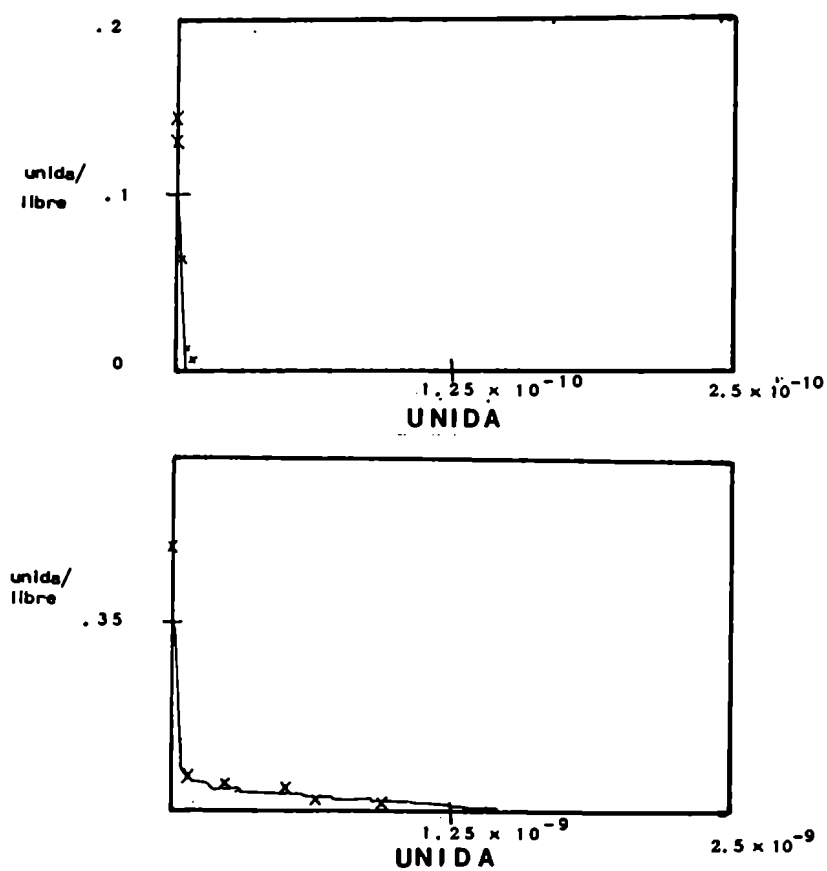
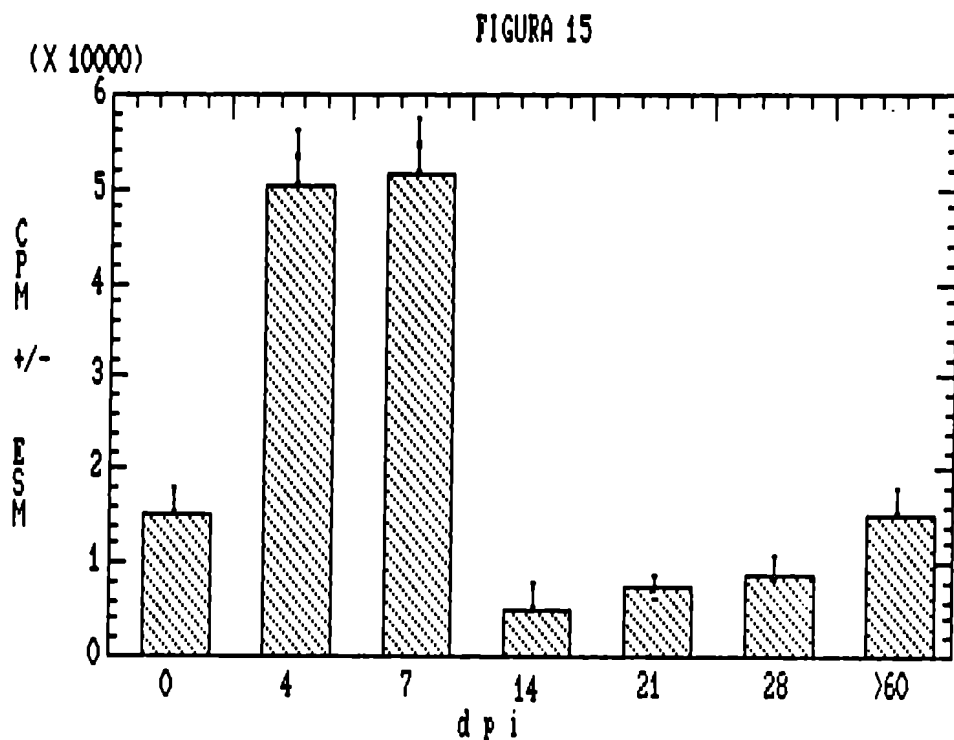


FIGURA 15

EFFECTO SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO DEL CELULAS DE BAZO DE ANIMALES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI.

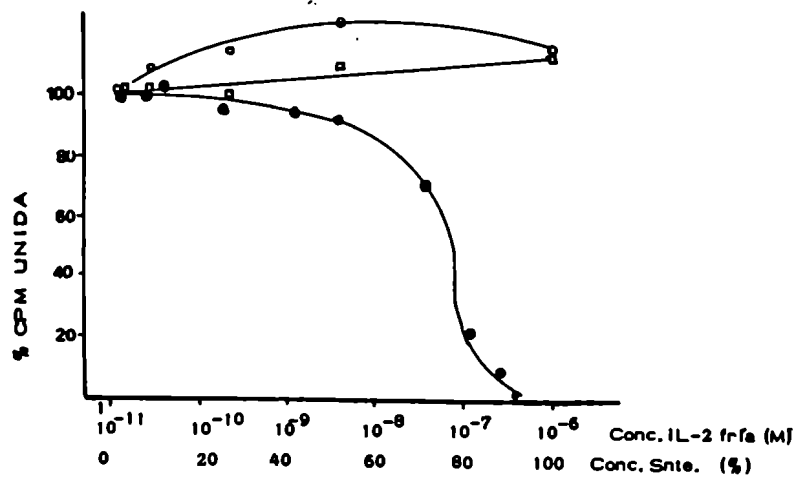


Se cultivaron células de bazo de ratones BALB/c (5×10^6 /ml) infectados con 50 tripomastigotes sanguíneos, a los tiempos pi indicados. Los sobrenadantes, cosechados a las 48 h, fueron mezclados con una cantidad constante de IL-2 recombinante, y adicionados en una concentración final de 15% a una suspensión células CTL.L (6000 células/pocillo). La proliferación de dichas células fue evaluada 24 horas mas tarde, añadiendose 1 uCi de [3 H]-timidina 4 horas antes de la cosecha.

Los resultados se expresan como la media de la [3 H]-timidina incorporada ante el tratamiento con sobrenadantes (concentración final 30%) individuales de por lo menos 4 animales por grupo \pm DS

FIGURA 16

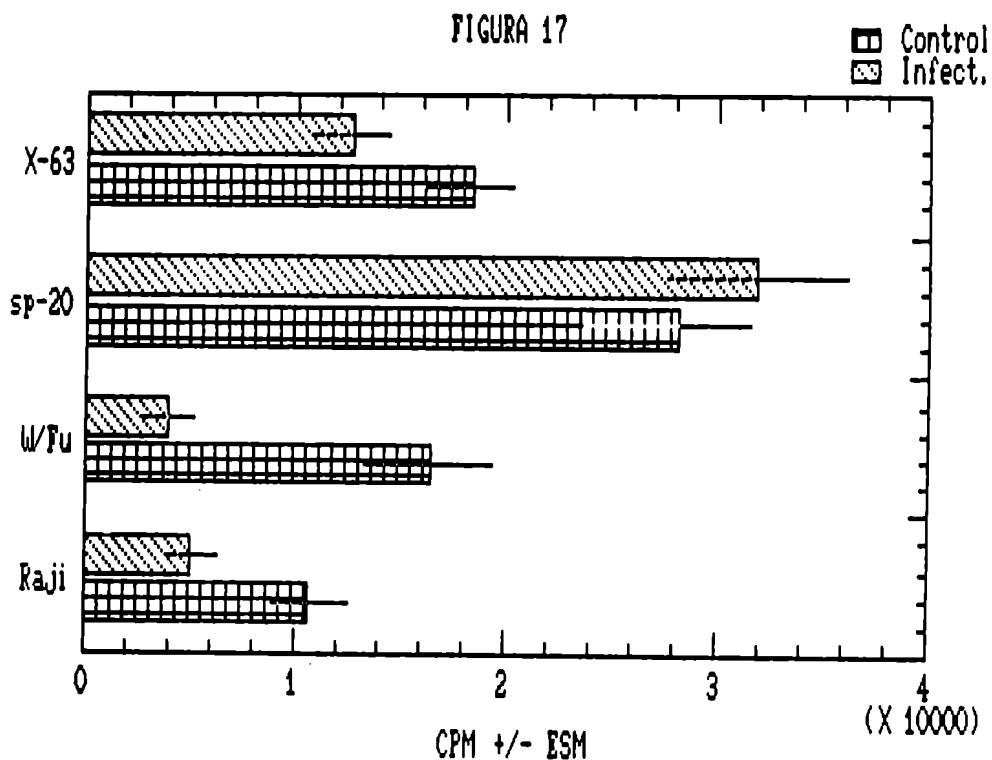
ANALISIS DE LA CAPACIDAD DE UNION AL RECEPTOR DE IL-2 DE LOS FACTORES SOLUBLES LIBERADOS POR CELULAS DE RATONES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI QUE INHIBEN LA PROLIFERACION DE CELULAS CTL.L.



Se incubaron 3×10^5 células CTL.L con $0.6 \mu\text{M}$ [^{125}I]-IL-2 recombinante y las concentraciones indicadas de rec-IL-2 fría o distintas diluciones del sobrenadante de cultivo de células de bazo ($5 \cdot 10^6$ /ml) de ratones BALB/c al 21 dpi. La figura muestra la media de triplicados de la cpm unidas con respecto al control (medio de cultivo). Los sobrenadantes de cultivo de células de ratones no infectados se utilizaron como control. Para mayores detalles ver la sección 3.21.

FIGURA 17

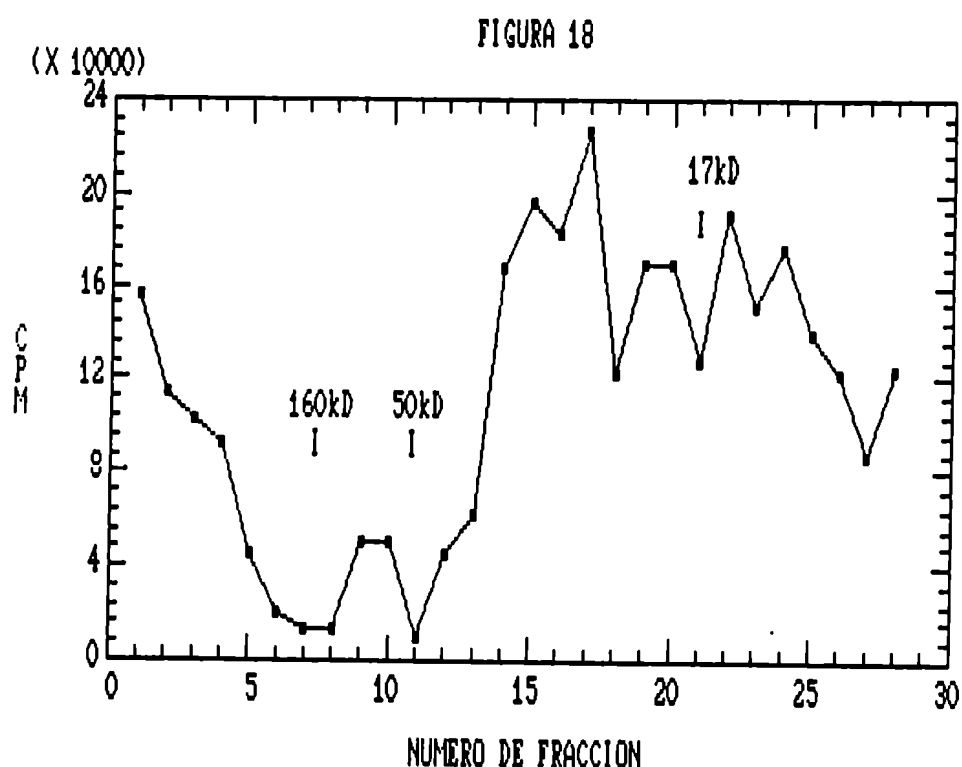
EFFECTO SIBRE LA PROLIFERACION DE LINEAS CELULARES NO DEPENDIENTES DE I1-2 DE FACTORES LIBERADOS EN EL SOBRENADANTE DE CELULAS DE BAZO DE RATONES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI.



Sobrenadantes de 48h de cultivos de células de bazo (5×10^6 /ml) de ratones al 21 dpi o normales se incubaron con células de las líneas indicadas, en una concentración final de 30%. Las condiciones y número de células utilizado es igual a la indicada para el ensayo CTL.L (sección 3.15). Los resultados se expresan como la media de la incorporación de radiactivo \pm ESM de los sobrenadantes de ratones individuales (3 ratones/grupo).

FIGURA 18

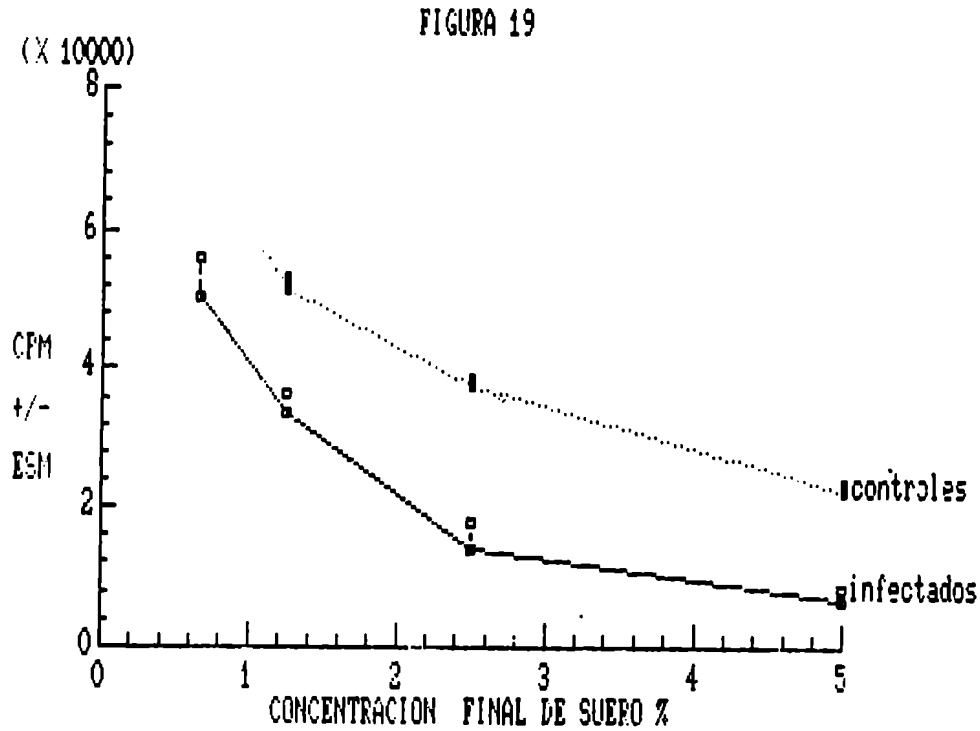
SEPARACION DE LOS FACTORES INHIBIDORES DE LA PROLIFERACION
CELULAR POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC).



Se cultivaron células de bazo ($4 \cdot 10^6/ml$) de un grupo de ratones BALB/c infectados al 21 dpi con 50 tripomastigotes sanguíneos. Se cosecharon los sobrenadantes a las 48 h de cultivo de diferentes ratones y 200 ml de sobrenadante fueron concentrados por liofilización. Se realizó la separación de los sobrenadantes liofilizados y reconstituidos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (ver la sección 3.25 para mayores detalles). Se evaluó la capacidad de 100 μl de las fracciones obtenidas de inhibir la proliferación de células CTL.L en presencia de una cantidad constante de rec-IL-2 como se describe en la leyenda de la figura 16. Los resultados se expresan como la [3H]timidina incorporada por cultivos triplicados. Se realizaron controles incubando las células CTL.L con IL-2 y con medio de cultivo solamente.

FIGURA 19

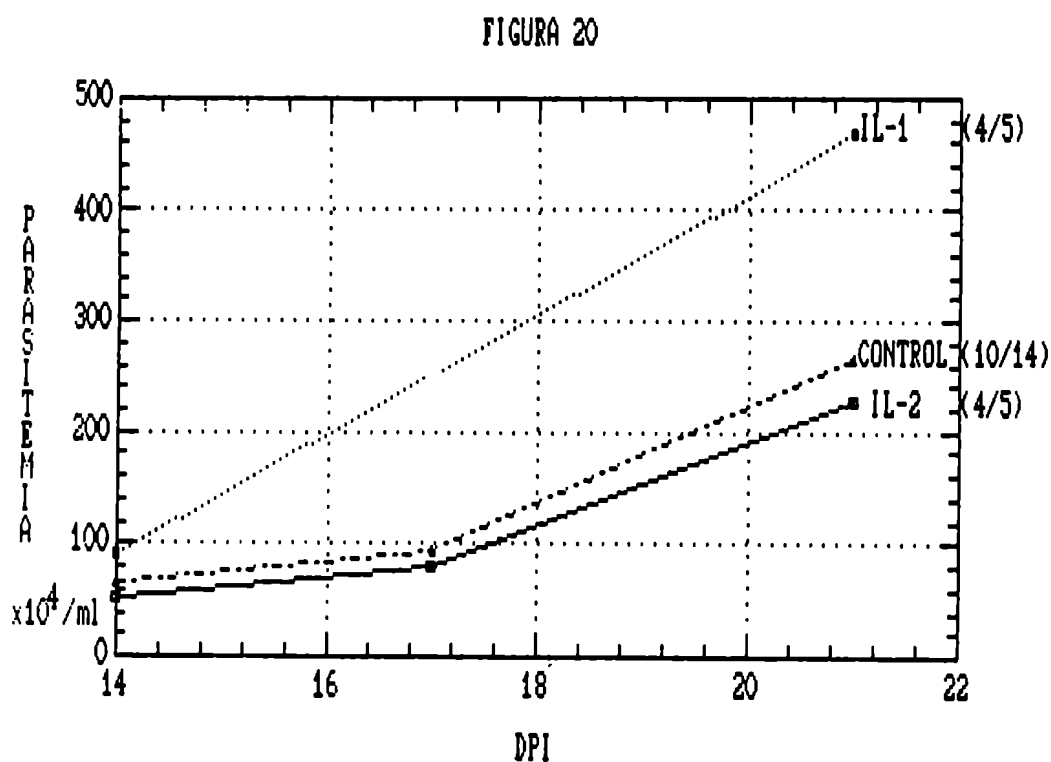
EFFECTO DEL SUERO DE RATONES INFECTADOS 21 DIAS CON TRYPANOSOMA
CRUZI SOBRE LA PROLIFERACION DEPENDIENTE DE IL-2 DE CELULAS CTL.L



Se separó el suero de ratones BALB/c infectados con 50 tripomastigotes sanguíneos de T. cruzi a los 21 días y de ratones controles no infectados, y se evaluó su capacidad de diluciones seriadas del mismo de inhibir la proliferación de células CTL.L en presencia de una cantidad constante de rec-IL-2. Los resultados se expresan como la media de los cultivos triplicados de tres ratones en cada grupo \pm ESM. Las diferencias son significativas al $p < 0.01$ (prueba t de Student). Para mayores detalles ver la sección 3.17.

FIGURA 20

EFFECTO DEL TRATAMIENTO IN VIVO CON IL-1 E IL-2 RECOMBINANTES, EN LA RESISTENCIA DE RATONES BALB/c A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI.



Ratones BALB/c fueron tratados ip con 2500 unidades/dosis de rec IL-2, 1 µg/dosis de rec IL-1 o 0.1 %BSA los días -1, 0, 1, 4, 7, 10 y 14 pi. Los animales fueron infectados con 50 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*. En paréntesis se muestra la mortalidad acumulada al día 30 pi en relación al número de ratones en el grupo. Para mayores detalles ver la sección 3.24. Las diferencias entre los grupos no son significativas (Prueba de Mann-Whitney para diferencias de medias).

FIGURA 21

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INTERFERON γ SOBRE LA RESISTENCIA A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI DE RATONES BALB/c.

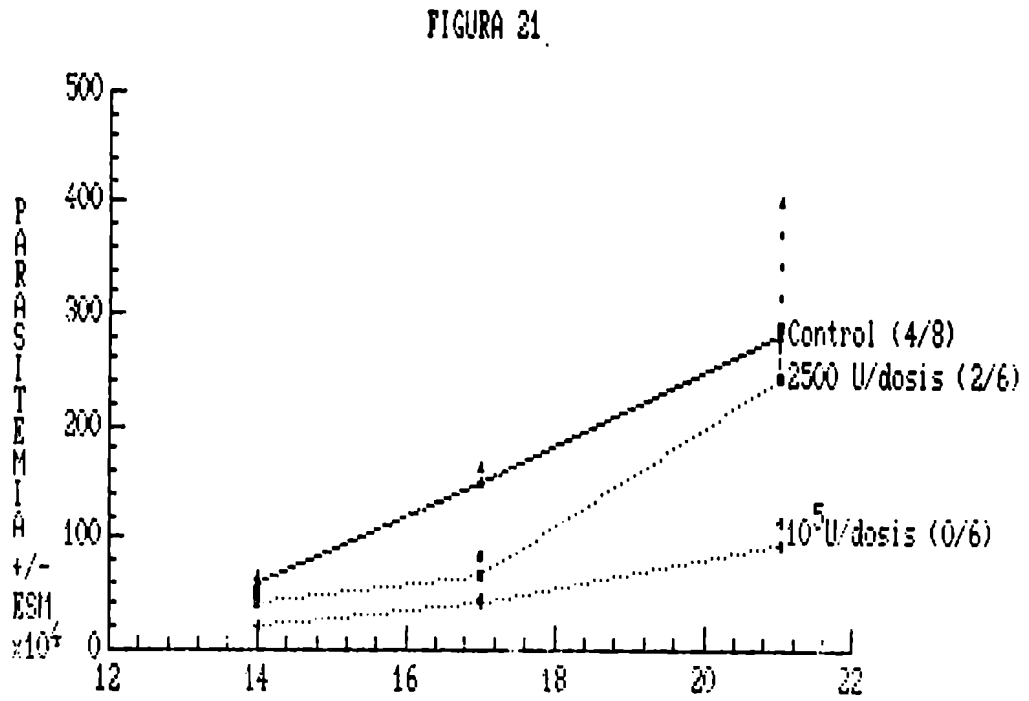


TABLA I
 PARASITEMIA Y MORTALIDAD DE RATONES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DE
TRYPANOSOMA CRUZI LUEGO DEL DESAFIO.

INMUNOGENO	Parasitemia 21 pi x10 ⁴ /ml ± ESM (N)	Mortalidad acumulada 40 pi (N) ^B
Control	47 ±8 (8)	41 %(54)
F-Bp	5 ±2 (14) _c	15 %(26) _d
F	26 ±6 (9)	45 %(20)
Bp	49 ±13(8)	30 %(30)
Mc	24 ±6 (5)	52 %(29)

Los ratones fueron inmunizados ip cada 2 semanas (3 dosis) con las fracciones subcelulares de T.cruzi: microsomal (Mc), flagelar adyuvada(F-Bp) o no (F) con B.pertussis, o con B.pertussis solamente (Bp). Cuatro semanas después de la última dosis los ratones se desafiaron con 50 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen .

^B: Mortalidad acumulada al día 40 pi. Datos de 3 experimentos independientes. Las diferencias respecto del control no inmunizado se presentan como c:(p<0.001 prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon) y d:(p<0.05, Chi cuadrado). En parentesis : número de ratones.

TABLA II
 ANTICUERPOS ANTI-TRYPANOSOMA CRUZI EN RATONES INMUNIZADOS CON
 ANTIGENOS DEL PARASITO.

INMUNOGENO	ELISA D.O. ⁴⁹² NM ± ESM		
	ANTES DESAFIO	DESPUES DEL DESAFIO	
		17 DPI	70-120 DPI
CONTROL	0.10±0.01 (12) ^A	0.54±0.08(8) ^B	0.69±0.05(11) ^A
FBp	0.92±0.05 (18)	1.02±0.05(8)	1.08±0.11(4)
F	0.68±0.05 (8) ^B	0.98±0.08(8)NS	0.85±0.17(4) ^B
Bp	0.18±0.02 (10) ^A	0.61±0.06(8) ^B	0.77±0.12(6) ^B
Mc	0.57±0.05 (8) ^B	1.03±0.09(6)NS	no realizado

Se inmunizaron ratones BALB/c con fracciones subcelulares de T.cruzi segun se describió en la seccion 3.4 y en la tabla I. Se sacrificaron ratones antes del desafio (un mes después de la última dosis de antígeno) y a los 17 y después de los 70 días del desafio con 50 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén. Se determinó el título de anticuerpos en un ensayo de ELISA , usando como antígeno un homogenato total de la forma epimastigote del parásito.

En paréntesis : número de animales/grupo.

En cada punto, los datos de ratones inmunizados con F-Bp fueron comparados estadísticamente con los de otros grupos. Las diferencias se presentan como ^A) p<0.001, ^B) p<0.005 y NS (no significativo), prueba t de Student .

Para mayor información ver la leyenda de la tabla I,
3.4, 3.5 y 3.6 de materiales y métodos.

TABLA III

REACCION CUTANEA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA EN RATONES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI.

		INDICE DE ESTIMULACION \pm ESM			
Inmunógeno (antg.desf)	Antes del desafío	Después del desafío			
		17 dpi	30 dpi	70-120 dpi	
Contr	HT	1.03 \pm .01(11)	1.02 \pm .01(14)	1.00 \pm .01(7)	1.14 \pm .02(8)
F-Bp	HT	1.25 \pm .07(5) ^c	1.17 \pm .04(5)	1.18 \pm .01(10) ^b	1.38 \pm .06(4) ^c
F	HT	1.05 \pm .02(4)	1.02 \pm .01(4)	1.05 \pm .01(6)	1.20 \pm .02(4)
Mc	HT	1.07 \pm .03(6)	1.05 \pm .01(6)	1.03 \pm .03(8)	1.16 \pm .02(4)
Contr	F	1.02 \pm .01(20)	1.03 (2)	1.01 \pm .01(5)	1.02 \pm .01(5)
F-Bp	F	1.08 \pm .02(8) ^d	1.09 \pm .02(4)	1.17 \pm .03(5) ^b	1.14 \pm .03(6)
F		1.03 \pm .01(9)	1.02 \pm .01(5)	1.02 \pm .02(5)	1.05 \pm .01(4)
Contr	Mc	1.03 \pm .01(17)	1.03 \pm .03(6)	1.03 \pm .01(17)	no realizado
Mc	Mc	1.03 \pm .01(24)	0.99 \pm .02(6)	1.03 \pm .01(12)	no realizado

Se inmunizaron grupos de ratones BALB/c con antígenos del parásito y se los desafió con 50 parásitos Tulahuén un mes después de la última dosis de inmunógeno. Se realizó la reacción cutanea inoculando 30 μ l de HT (50 μ g), F(80 μ g) o Mc(80 μ g),

antes o después del desafío. Se midió el grosor de la almohadilla plantar 48 horas después de la administración del antígeno .

En paréntesis: número de ratones.

Los datos de animales inmunizados fueron comparados con los de ratones no inmunizados en cada punto de la infección. Las diferencias se presentan como a: $p < 0.001$, b: $p < 0.01$, c: $p < 0.02$ o d: $p < 0.01$, prueba t de student. Para mayor información sección 3.3 , 3.4 y 3.8.

TABLA IV

LA TRANSFERENCIA DE SUERO DE RATONES CRONICAMENTE INFECTADOS CONFIERE RESISTENCIA AL DESAFIO CON 50 PARASITOS TRYPANOSOMA CRUZI

Suero transferido	Condiciones	(N)	Parasitemia 10 ⁴ /ml±ESM 21 dpi	Mortalidad Acumulada 25 dpi (%)
Normal	0.2 ml, 2h antes +0.2ml, 3 dpi	(9)	140 ± 53	67
Crónico	ibidem	(9)	28 ± 7 ^B	11 ^A
Crónico	0.2 ml, 2h antes	(4)	42 ± 17	25
Crónico	0.2ml, 3 dpi	(4)	62 ± 31	50

Se transfirió a receptores singeneicos suero de ratones BALB/c cronicamente infectados o normales. Se infectaron estos ratones con 50 tripomastigotes sanguíneos Tulahuén.

^A) Indica diferencias significativas al comparar la mortalidad con la del grupo transferido con suero normal ($p \leq 0.05$ prueba de Fisher exacta).

^B) Indica diferencias significativas al comparar la parasitemia con la del grupo transferido con suero normal ($p \leq 0.05$ prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon)

TABLA V

TRANSFERENCIA PASIVA DE SUERO DE ANIMALES INMUNIZADOS CON F-Bp O CRONICAMENTE INFECTADOS.

Ratones receptores de (n)	ELISA DO _{412nm} ±ESM	Parasitemia x10 ⁻⁴ /ml±ESM	Mortalidad Acumulada 40pi(%)
Suero cronico (9)	0.69±0.05 ^c	28±8 ^b	22 ^a
Suero F-Bp (9)	0.92±0.05	122±43	78
Suero normal (9)	0.10±0.01 ^c	140±53	67

Se transfirió a ratones singeneicos normales con 0.4 ml (0.2ml 2 horas antes y 0.2 ml 48 horas pi) suero de ratones BALB/c cronicamente infectados o de ratones inmunizados con F-Bp según el esquema de inmunización descrito en la sección 3.4, obtenido un mes después de la última dosis de inmunógeno. La infección fue realizada según se describió en la sección 3.5. Se registró la parasitemia al 21 dpi y la mortalidad acumulada al 40 dpi.

Se determinó el título de anticuerpos IgG anti I.cruzi según se descrito en la sección 3.6.

En paréntesis el número de animales.

^a) La diferencia con el grupo control es significativa (p≤0.005 Chi-cuadrado).

^b) La diferencia con el grupo control es significativa (p≤0.05 prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon).

^c) La diferencia con el grupo inmunizado con FBp es significativa (p≤0.02 prueba t de Student)

TABLA VI

LA TRANSFERENCIA DE CELULAS DE BAZO DE RATONES CRONICAMENTE INFECTADOS POR VIA IV O IP CONFIERE RESISTENCIA A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

No.Células transferidas	Vía	Parasitemia x10 ⁻⁴ /ml±ESM 21pi (N)	Mortalidad Acumulada 25pi(%)
Control		101 ± 18	(23) 50
100x10 ⁶	iv	20 ± 11 ^A	(11) 0 ^D
50x10 ⁶	iv	22 ± 12 ^B	(4) 0 ^D
25x10 ⁶	iv	10 ± 8 ^C	(4) 0 ^D
10x10 ⁶	iv	52 ± 42	(4) 75
100x10 ⁶ (inact)	iv	67 ± 30	(4) 25
50x10 ⁶	ip	5 ± 5 ^D	(4) 0 ^D

Se transfirió a receptores BALB/c, células de bazo de ratones singeneicos, infectados con 50 parásitos Tulahuén 60 días a 1 año antes del sacrificio, o de ratones normales. Veinticuatro horas mas tarde los receptores fueron desafiados con 50 tripomastigotes sanguíneos Tulahuén. En paréntesis el número de ratones.

Las diferencias con las parasitemias del grupo control son significativas A: p ≤ 0.005; B: p ≤ 0.01 o C: p ≤ 0.05, prueba de Mann-Whitnev-Wilcoxon.

P) Las diferencias con la mortalidad acumulada del grupo control son significativas ($p \leq 0.05$ prueba exacta de Fisher).

TABLA VII

TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA POR CELULAS DE BAZO DE RATONES BALB/c CRONICAMENTE INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI ENRIQUECIDAS EN LINFOCITOS T

CELULAS TRANSFERIDAS	RELACION B/T	PARASITEMIAx10 ⁴ ±ESM (21dpi)	MORTALIDAD ACUMULADA 40pi
Control de infec.	1.90	88 ± 21 (18)	15/32
Lana de nylon	0.14	14 ± 6 (10) ^B	0/5 ^A
Panning anti IgG	0.09	29 ± 7 (6) ^C	0/5 A
Sephadex-G10	0.40	24 ± 11 (9) ^P	2/10

Se transfirió células de bazo de ratones BALB/c normales (control de infección) o infectados crónicamente a receptores singeneicos vírgenes. Se deplecionó de células B y adherentes por pasaje de la suspensión celular por una columna de lana de nylon, panning en un frasco recubierto con anti IgG o Sephadex G10, según se describió en las secciones 3.12, 3.13 y 3.14. Se indica la relación B/T de las células transferidas, determinada mediante un análisis de inmunofluorescencia directa, utilizando anti Thy 1.2 o anti IgG de ratón marcados con fluoresceína. Se transfirieron en todos los casos 5 x 10⁷ células, y se desafió a los animales con 50 parásitos un día después de la transferencia.

En parentesis: número de ratones /grupo.

A) La diferencia de la mortalidad acumulada con el grupo control es significativa $p \leq 0.01$ Chi cuadrado.

B) Las diferencias con las parasitemias con las del grupo control es significativa (A: $p \leq 0.05$; B: $p \leq 0.05$ o D: $p \leq 0.01$ prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon)

TABLA VIII

EFEECTO DE LA DEPLECION DE DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE CELULAS T CON ANTICUERPOS Y COMPLEMENTO SOBRE LA CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA DE CELULAS DE BAZO DE RATONES CRONICAMENTE INFECTADOS.

TRATAMIENTO (N)	PARASITEMIA ($\times 10^4$ /ml) \pm ESM			MORTALIDAD ACUMULADA 25 dpi
	13	DPI 17	20	
Control inf. (12)	52 \pm 15	212 \pm 61 ^A	197 \pm 53 ^A	7/12
Céls. totales (12)	6 \pm 2	8 \pm 3 ^B	7 \pm 3 ^B	0/6 ^C
anti Thy1.2 (11)	12 \pm 4	30 \pm 7 ^B ^A	31 \pm 9 ^B ^A	0/11 ^C
anti Lyt2.2 (11)	11 \pm 3	16 \pm 9 ^B	24 \pm 13 ^B	0/11 ^C
anti Lyt1.2 (6)	23 \pm 2	19 \pm 5	4 \pm 2 ^B	0/6 ^C

Se obtuvieron células de bazo de ratones BALB/c cronicamente infectados. Se deplecionó esta suspensión celular de células T totales, T colaboradoras o T supresoras/citotóxicas por tratamiento con los anticuerpos monoclonales anti Thy 1.2, anti Lyt 1.2 o anti Lyt 2.2 respectivamente y complemento. Se transfirió iv a receptores singeneicos 5×10^7 células así tratadas, además de una suspensión de células de bazo tratadas solo con complemento (Células totales). Los animales así tratados y un grupo no tratado se infectaron 24 hs más tarde. Las diferencias con respecto al grupo "Células totales" (^A) o "Control de infección" (^B) es significativa ($p \leq 0.05$ prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon).

*)La diferencia en la mortalidad acumulada con respecto a los controles es significativa ($p \leq 0.05$ prueba exacta de Fisher). Para mayores detalles ver la sección 3.15.

TABLA IX

EFFECTO DEL TRATAMIENTO IN VIVO DE ANIMALES BALB/c CON ANTI THY 1.2 SOBRE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA A CON A

Tratamiento	(N)	LINFOPROLIFERACION x (cpm)±ESM	
		CON A	MEDIO
Suero de rata	(2)	252216±11935	4086±58
Anti Thy 1.2	(3)	97470±25627 [^]	2923±79

Se trataron animales de la cepa BALB/c con anti Thy 1.2 iv . Tres días después los animales fueron sacrificados y las células de bazo obtenidas fueron cultivadas en presencia de Con A (10 µg/ml) por 72 horas y la respuesta proliferativa medida por incorporación de timidina tritiada. Se incluyeron como controles animales tratados con suero de rata normal.

La diferencia con el grupo control es significativa (p≤ 0.01 prueba t de Student).

Ver la sección 3.11 para mayores detalles experimentales.

TABLA X

EFFECTO DEL TRATAMIENTO **IN VIVO** DE RATONES BALB/c CON ANTI ASIALO GM-1 SOBRE LA ACTIVIDAD NK.

A. CELULAS EFECTORAS DE ACTIVIDAD NK NO ESTIMULADAS.

LISIS ESPECIFICA (%) X ± ESM

TRATAMIENTO	(N)	RELACION EFECTOR/BLANCO			
		200:1	100:1	50:1	25:1
CONTROL	(2)	5.4±0.4	4.2±0.3	0.6±0.1	-0.4±0.9
ANTI-THY 1.2	(2)	8.5±1.5	6.7±3.3	3.3±2.2	1.3±0.2
ANTI-ASI.GM1	(2)	-2.0±1.0	-1.6±2.4	-0.7±3.1	-1.0±0.5

B. CELULAS EFECTORAS DE ACTIVIDAD NK ESTIMULADAS CON INTERFERON IN VITRO

LISIS ESPECIFICA (%) X ± ESM

TRATAMIENTO	(N)	RELACION EFECTOR/BLANCO			
		200:1	100:1	50:1	25:1
CONTROL	(2)	17±2	17±6	10±1	7±1
ANTI THY 1.2	(2)	24±5	26±1	19±1	11±1
ANTI-ASI.GM1	(3)	2±1	1±8	5±5	-1±1

La actividad NK fue medida cultivando por 4 h, células de bazo de ratones BALB/c tratados 3 días antes con anti asialo GM-1, anti Thy 1.2 o suero de rata como control, con células YAC-1 marcadas con ^{51}Cr para medir actividad NK. En la tabla XB se efectuó una preincubación de las células efectoras con 100 U/pocillo de interferón α - β durante 2h. N: número de animales. Para detalles experimentales ver sección 3.18

TABLA XI

EFFECTO DEL TRATAMIENTO **IN VIVO** CON ANTI- NK 1.1 Y CON ANTI- ASIALO GM-1 SOBRE LA ACTIVIDAD NK DE RATONES C57B1/6.

TRATAMIENTO (N)	LISIS ESPECIFICA (%)X ± ESM			
	RELACION EFECTOR:BLANCO			
	200:1	100:1	50:1	25:1
CONTROL (3)	22±3	17±1	8±1	3±1
ANTI NK 1.1 (3)	-1±1	-2±1	1±1	3±4
ANTI A.GM1 (3)	-2±1	-2±1	0±1	3±1

Se trataron ratones de la cepa C57BL/6 con anti asialo GM-1, anti NK1.1 o suero de rata normal como control. Tres días más tarde se sacrificaron los ratones y se cocultivó durante 4 horas células de bazo de los mismos con células de la línea YAC-1 marcadas con ^{51}Cr para medir actividad NK. N: número de animales.

Para detalles experimentales ver sección 3.18.

TABLA XII

EXPRESION DEL RECEPTOR DE INTERLEUQUINA 2 SOBRE CELULAS DE BAZO DE ANIMALES AL DIA 4 POST INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

Tratamiento	^A % unión especifica	^B positivo/total
Controles	-0.5±2.2	0/4
1 parásito	11.7±4.4	3/4
50 parásitos	22.8±6.2	5/5
2x10 ⁴ parásitos	15.9±6.8	3/4
Con A	72.5	

Se obtuvieron células de bazo de ratones BALB/c infectados con los números de T.cruzi indicados y sacrificados 4 días pi. Células (5x10⁶/ml) fueron cultivadas por 48 horas a 37°C y la presencia del receptor de IL-2 se midió utilizando 1 nM de [¹²⁵I]-IL-2 y 20 µM de rec-IL-2 fría (para medir así la marca unida inespecíficamente). Para mayores detalles ver sección 3.21. Los resultados se expresaron como:

^A: Media aritmética del % de unión especifica ± ESM calculado de acuerdo a la siguiente fórmula :

$$[(\text{cpm unida} - \text{cpm de unión inespecífica}) / \text{cpm unida}] \times 100 =$$

Las diferencias entre el control y los grupos experimentales son significativas (p≤0.05 prueba t de Student).

• La unión específica significativa de ^{125}I -IL-2 fue analizada para cada muestra utilizando la prueba de t no pareada (cpm unida vs cpm inespecífica). Los datos se muestran como el número de ratones que expresan el receptor de IL-2 ($p < 0.05$) / número de muestras analizadas en cada grupo.

TABLA XIII

EFECTO SOBRE LA EXPRESION DEL RECEPTOR DE IL-2 AL 4 DPI DEL TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS CONTRA DIFERENTES SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y COMPLEMENTO.

TRATAMIENTO	% UNION ESPECIFICA	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.
Cont.complemento	24.0	p<0.025
anti Thy 1.2	2.5	N.S.
anti Lyt 2.2	19.4	p<0.005
cels no adh.	42.0	p<0.005

Células de bazo de ratones BALB/c al 4 dpi fueron tratadas con anti Thy 1.2 o anti Lyt 2.2 por 1 hora a 4°C y luego con complemento de conejo por 1 hora a 37°C. La depleción de células adherentes al plástico se realizó incubando en frascos de plástico 2 horas a 37°C. Las células fueron cosechadas cuidadosamente y reincubadas por otras 2 horas a 37°C. Las células así tratadas fueron cultivadas durante 48 h a 37°C, y el receptor de IL-2 medido por un ensayo de unión utilizando ¹²⁵I-rec-IL-2 en forma similar a lo descrito en la tabla XI. Los resultados expresan el porcentaje de unión específica al comparar la marca total unida con la no unida después del agregado de una solución 20 µM de rec-IL-2 frío de la manera indicada en la tabla XI. Se indica además el grado de significación de dicha unión (test de t para muestras no pareadas).

TABLA XIV
 CINETICA DE RESPUESTA PROLIFERATIVA A CON A DURANTE LA INFECCION
 CON TRYPANOSOMA CRUZI.

Grupo	LINFOPROLIFERACION (cpm)		
	ConA 10µg/ml	ConA 5µg/ml	medio
Control	289100±9800	371600±57800	4100±800
4 dpi	244800±25400	203700±16300	33000±5900
7 dpi	360300±48000	474800±61000	46400±13600
14 dpi	198000±51800	160100±24300	4100±2200
21 dpi	42200±18900	57100±17900	5400±1900

Grupo	ConA 10µg/ml	ConA 5µg/ml	medio
Control	347400±18800	413300±16900	11400±4600
14 dpi	308400±43000	193300±16900	14600±3900
21 dpi	88200±19900	94600±26500	3300±400
28 dpi	242700±37000	191200±18000	5900±700
60 dpi	172800±26200	218500±10500	4400±1600

Se cultivaron células de bazo ($3 \cdot 10^5$ /pocillo) de ratones BALB/c infectados con 50 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén (n=4 ratones/grupo), al tiempo indicado pi, o de controles

normales en presencia de ConA (10 o 5 $\mu\text{g/ml}$) durante 37°C y se midió la incorporación de [^3H]-timidina en por triplicado. Se muestran dos experimentos independientes. Ver la sección 3.11 para mayores detalles.

TABLA XV

CINETICA DE PRODUCCION DE IL-2 POR CELULAS DE BAZO ESTIMULADAS CON CON A DURANTE LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

PROLIFERACION DE CTL.L (cpm) X ± ESM

MC agregado

DPI	(N)	MC agregado	
		10%	3%
0	(4)	106190 ± 21686	99586 ± 22547
4	(4)	85305 ± 13869	33357 ± 3903
14	(3)	13173 ± 5895	4986 ± 3553
21	(5)	2785 ± 1738	919 ± 310
28	(5)	18300 ± 6521	3761 ± 1410
>60	(3)	86855 ± 19708	40566 ± 16978

Control negativo (solo medio de cultivo): 378 ± 44 cpm

Se obtuvieron células de bazo de ratones BALB/c infectados con 50 tripomastigotes sanguíneos a los tiempos pi indicados. Estas células fueron cultivadas (5×10^6 células/ml) en presencia de Con A (10 µg/ml) por 48 hs a 37°C. Los sobrenadantes fueron cosechados (MC) y la presencia de IL-2 determinada en un ensayo de proliferación de células CTL.L.

Para mayores detalles ver la sección 3.20.

TABLA XVI

LINFOPROLIFERACION Y PRODUCCION DE IL-2 EN RESPUESTA A ANTIGENOS DE LA FORMA TRIPOMASTIGOTE DE TRYPANOSOMA CRUZI POR CELULAS DE BAZO DE RATONES CRONICAMENTE INFECTADOS.

LINFOPROLIFERACION (cpm) X ± DS

GRUPO

Tripos/ml	Control (N=5)	Infectado (N=6)
5.10 ⁶	21400 ± 10400	84100 ± 25700 ^B
10 ⁶	15100 ± 2500	39097 ± 8500 ^A
2.10 ⁵	13100 ± 2100	23800 ± 3500 ^A
Medio	12000 ± 3200	9277 ± 526

PROLIFERACION CTL.L (cpm) X ± DS

GRUPO

Medio cond.	Control (N=3)	Infectado (N=3)
30	6510 ± 2300	1460 ± 280
10	2050 ± 420	1050 ± 70
Medio	1150 ± 70	

Se obtuvieron células de bazo de ratones BALB/c crónicamente infectados y se realizó un ensayo de linfoproliferación en respuesta a las cantidades indicadas de tripomastigotes inactivados según se describió en la sección 3.11. Se obtuvo además el sobrenadante de cultivo de 48hs de dichas células ($5 \cdot 10^6$ /ml) en respuesta a 10^6 tripomastigotes de cultivo inactivados por calor, y se midió la presencia de IL-2 por un ensayo de células CTL.L descrito en la sección 3.20. N: número de ratones /grupo. Las diferencias entre los grupos control e infectados para cada dilución de antígeno son significativas

^B $p \leq 0.0006$; ^A ≤ 0.0002 ; $p \leq 0.025$ prueba t de Student.

TABLA XVII

CARACTERIZACION FENOTIPICA DE CELULAS DE ANIMALES NORMALES O INFECTADOS AL 21 DPI CON TRYPANOSOMA CRUZI DESPUES DE LA ESTIMULACION CON CON A.

MARCADOR	% CELULAS POSITIVAS	
	Control	Infectado
Thy 1.2.	37.7	32.3
Lyt 2.2.	21.4	21.7
L3T4	17.6	11.8
Receptor IL-2	24.7	1.7

Células de bazo ($5 \cdot 10^6$ /ml) de animales infectados (21 dpi) con 50 tripomastigotes sanguíneos o normales fueron estimuladas con Con A ($10 \mu\text{g/ml}$) durante 48 horas, y teñidas con los anticuerpos monoclonales específicos contra los marcadores indicados, y anti-IgG de rata o estreptoavidina marcados con fluoresceína. Los resultados expresan el número de células positivas a partir del análisis de FACS. Ver la sección 3.7 (materiales y métodos) para mayores detalles experimentales.

TABLA XVIII

NUMERO Y AFINIDAD DE RECEPTORES IL-2 CALCULADO A PARTIR DE LOS DATOS DE LA FIGURA 13.

Fuente de células	Alta afinidad		Baja afinidad	
	Kd(pM)	nro/célula	Kd(nM)	nro/célula
Normal	20	481	30	81900
Infectado	19	115		

Se cultivaron (5×10^4 /ml) células de bazo de animales infectados (21 dpi) con 50 tripomastigotes sanguíneos o normales en presencia de ConA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). Se midió el número y afinidad de receptores de IL-2 en las mismas en un ensayo de competencia utilizando el ligando [^{125}I]-IL-2. A partir de los datos volcados en la figura 14 se determinó el número y la afinidad de los receptores de IL-2. La afinidad esta indicada por la pendiente de las curvas. El número de receptores de IL-2 se calculó multiplicando el punto en donde la curva corta las abscisas por el número de Avogadro.

TABLA XIX

CAPACIDAD DE RESPUESTA PROLIFERATIVA A IL-2 DE CELULAS DE RATONES INFECTADOS ESTIMULADAS CON CON A.

IL-2 U/ml	PROLIFERACION (cpm) X ± ESM	
	FUENTE DE CELULAS	
	Normal	Infectado
20	10356 ± 776 ^a	1331 ± 99 ^a
2	11224 ± 941 ^a	1035 ± 78 ^a
0.2	10877 ± 435 ^a	750 ± 90
0	2034 ± 142	720 ± 69

Se generaron blastos de Con A de 48h provenientes de animales infectados con 50 parásitos Tulahuen al 21 dpi o normales en la forma descrita en la sección 3.17. Las células fueron incubadas durante 72 horas con las concentraciones de IL-2 recombinante indicadas y la proliferación celular determinada por la incorporación de [³H]-timidina. Los datos de la tabla son representativos de tres experimentos independientes.

^a) Las diferencias son significativas a un p<0.05 vs células no estimuladas (prueba t de Student).

TABLA XX

EFFECTO DEL TRATAMIENTO IN VIVO CON IL-2 SOBRE LA RESISTENCIA DE RATONES C57BL/6 A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI

TRATAMIENTO	(N)	parasitos.10 ⁻⁴ /ml±ESM			MORTALIDAD
		DPI			ACUMULADA
		14	17	21	30 dpi (%)
Control	(5)	83±10	102±32	161±31	60
rec-IL-2-FIA	(5)	100±30	250±66	303±78	80
FIA	(5)	121±39	211±103	no realizado	60

Ratones C57BL/6 fueron tratados sc con 2500 U/dosis de rec-IL-2 adyuvado con Freund incompleto (FIA), PBS+ 0.1% de BSA adyuvado en Freund incompleto, o PBS + 0.1 % de BSA los días -1, 0, 1, 4, 7, 10, 14 post infección con 50 parásitos Tulahuén.

Las diferencias en mortalidad acumulada y parasitemia no son significativas (prueba de Chi cuadrado y Mann-Whitney respectivamente). N: número de animales por grupo. Para mayores detalles ver sección 3.19.

Nota: En experiencias paralelas IL-2 no adyuvada con FIA no produjo efecto sobre la resistencia a la infección de la cepa

TABLA XXI

LA ADMINISTRACION DE UNA SOLA DOSIS DE INTERFERON GAMMA AU
LA RESISTENCIA DE LOS RATONES CONTRA LA INFECCION POR UNA
LETAL DE TRYPANOSOMA CRUZI

TRATAMIENTO(N)	Parasitemia ($\times 10^{-4}/\text{ml}$) \pm ESM			Mortalidad acumulada 30 pi (%)
	DPI			
IFN-GAMMA (7)	10 \pm 4 ^B	42 \pm 7 ^B	85 \pm 17 ^C	0 ^A
CONTROL (8)	50 \pm 23	96 \pm 19	198 \pm 48	50

Se administraron 10⁵ unidades de rec-inteferón gamma o BSA en PBS como control a ratones BALB/c 24h antes de la infe con 50 tripomastigotes sanguíneos Tulahuen. La diferencia mortalidad con el grupo control es significativa (^A: p \leq prueba de Fisher Exacta). Las diferencias de las parasitemia ei grupo control son significativas (^B: p \leq 0.02 o ^C: p \leq 0.05 p de Mann-Whitnev-Wilcoxon).

TABLA XXII

EFFECTO SOBRE LA RESISTENCIA A LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CR
DEL TRATAMIENTO CON INTERFERON ALFA -BETA.

PARTE A:

TRATAMIENTO	N	Parasitemia ($\times 10^{10}/ml$) $\bar{X} \pm ESM$		
		DPI		
		14	17	21
CONTROL	13	61 \pm 15	119 \pm 23	249 \pm 3
1) IFN	6	36 \pm 7 ^A	48 \pm 12 ^A	102 \pm 34 ^A
2) IFN	5	11 \pm 8 ^A	57 \pm 13 ^A	320 \pm 125
3) IFN	5	62 \pm 10NS	203 \pm 41NS	No realizado

PARTE B:

TRATAMIENTO	N	% MORTALIDAD ACUMULADA		
		DPI		
		22	24	28
CONTROL	14	50	57	57
a) IFN	7	0 ^B	0 ^B	17 ^C
b) IFN	5	20	40	60
c) IFN	5	100	100	100

Ratones BALB/c fueron tratados ip con 2.5×10^7 unidades /dosis de interferón α - β día por medio antes y durante la infección con tripomastigotes sanguíneos de T.cruzi.

1): desde el día previo hasta el día 15 pi

2): Desde el día previo hasta el día 5 pi

3): Desde el 7 al 15 dpi.

Los controles fueron inoculados con PBS-0.1% BSA según el esquema 1). ^A: Las diferencias de las parasitemias con respecto al control son significativas ($p < 0.05$ prueba de Mann-Whitney para diferencias de medias). Las diferencias de la mortalidad con respecto al grupo control son significativas ^B: $p \leq 0.025$, ^C: $p \leq 0.01$ Fisher exacta)

TABLA XXIII

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON INDOMETACINA SOBRE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA A CON A DE CELULAS DE BAZO DE RATONES INFECTADOS AL 21 DPI

		LINFOPROLIFERACION (cpm) X ± ESM			
		TRATAMIENTOS			
INFECCION	CONA	Indometacina 10 µg/ml	Indometacina 5 µg/ml	Etanol	Medio
SI	SI	9559±1424	13095±2980	13612±701	18014±2825
NO	SI	71901±7013	75947±4605	67500±9300	83154±12420
SI	NO	1011±100	1679±119	1796±232	1771±60
NO	NO	671±58	892±55	1235±33	1305±202

Células de bazo ($3 \cdot 10^5$ /pocillo) de ratones BALB/c (n=3) infectados con 50 parasitos o de controles no infectados fueron estimuladas o no con ConA (10 µg/ml) en presencia de indometacin en las concentraciones indicadas o de etanol a la misma concentración que la presente en la solución de indometacin agregada.

Luego de 72 horas de cultivo a 37°C, se midió la respuesta proliferativa por la incorporación de [3 H]-timidina.

Para mayores detalles experimentales ver la sección 2.11.

TABLA XXIV

EFFECTO DE LA INHIBICION DE LA VIA DEL ACIDO ARAQUIDONICO SOBRE PRODUCCION DE FACTORES SOLUBLES QUE INHIBEN LA PROLIFERACION CELULAR DURANTE LA INFECCION CON TRYPANOSOMA CRUZI.

PROLIFERACION DE P-815 (cpm) X ± ESM

Concentración final de MC (%)

Fuente	30%	10%	3%
Control	4456	4868	5086
Infectado	3028	3356	3830
Contr+ Indo	3873	4126	4958
Infec+ Indo	3176	2946	3503

Células de bazo de ratones BALB/c infectados (21 dpi) con T.cruzi o controles fueron cultivadas ($5 \cdot 10^6$ células/ml) presencia o no de indometacina (10 µg/ml) durante 48 h a 37°C. L sobrenadantes fueron cosechados y se midió su capacidad de inhib la proliferación de células de la linea P-815. Para ello cultivaron 2×10^4 células en presencia de las concentracion indicadas de los sobrenadantes durante 24 h. Se añadió 1 µCi [³-H]-timidina 4 h antes de la cosecha.

6: DISCUSION

Un sistema de inmunoprotección experimental contra la infección con Trypanosoma cruzi en un modelo murino ha sido desarrollado en nuestro laboratorio, utilizando como inmunógeno la fracción subcelular flagelar (F) del parásito (206, 207, 229).

Al adyuvarse con Bordetella pertussis, la fracción flagelar mostró capacidad de inmunoprotección (207). En el presente estudio demostramos esta capacidad utilizando para el desafío 50 tripomastigotes sanguíneos. La administración de FBp protegió a los animales del desafío en términos de parasitemia, mortalidad y esplenomegalia, características de la fase aguda de infección por Trypanosoma cruzi (21). Esta protección fue significativa aunque parcial, ya que se detectó parasitemia por observación directa en la mayoría de los ratones inmunizados y desafiados. En estos animales los niveles de parasitemia fueron menores que en los controles. La inmunización con la fracción F no adyuvada, en cambio, no protegió a los ratones de la infección.

Demostramos que la fracción flagelar adyuvada con Bordetella pertussis estimula las ramas humoral y celular de la respuesta inmune. La presencia del adyuvante genera una respuesta de anticuerpos específicos que, antes del desafío, presenta mayores niveles que la de los inmunizados con el antígeno sin adyugar, aunque después de la infección los títulos sean semejantes.

Con el objeto de estudiar el papel de los anticuerpos específicos en la protección realizamos experiencias de transferencia pasiva de suero a ratones singeneicos normales.

En nuestro modelo experimental la transferencia de anticuerpos de animales protegidos por la inmunización con F-Bp no transfirió resistencia al desafío con el parásito. En cambio el suero de animales crónicamente infectados fue capaz de conferir protección parcial a los receptores, a pesar de que los títulos de anticuerpos específicos eran menores. Otros trabajos muestran la transferencia de resistencia por suero de animales infectados crónicamente (100, 105, 118, 143, 144, 274, 270). Nuestros resultados concuerdan con aquellos presentados por Scott y colaboradores en los que animales inmunizados con una glicoproteína de 90 Kd de T.cruzi (213), protegidos o no de acuerdo al adyuvante utilizado (saponina da resultados positivos) mostraron similares niveles de anticuerpo IgG2a e IgG2b, inmunoglobulinas asociadas a la resistencia en la infección con T.cruzi (247), es decir la protección conferida por este antígeno tampoco se debía a la presencia de una respuesta inmune humoral específica. No debería descartarse la posibilidad de que anticuerpos provenientes de animales inmunizados con la fracción flagelar sean capaces de transferir protección frente al desafío si se consideraran periodos diferentes después de la inmunización, o de animales inmunizados según un esquema diferente.

En coincidencia con nuestros resultados, el suero de inmunizados con epimastigotes de la cepa Y, adyuvados con saponina (143) o con epimastigotes viables de la cepa Tulahuen (187) no fueron capaces de transferir protección al ratón receptor, a pesar de que dichas inmunizaciones conferían al dador protección frente a dosis letales de T.cruzi. Esto indica que a

pesar de que antígenos de la forma epimastigote son capaces de inducir una respuesta protectora, los mecanismos de inducción de respuesta humoral protectora están ausentes, ya sea por ausencia o falta de procesamiento de los antígenos involucrados en esta respuesta.

Se debería también indicar que la fracción subcelular flagelar ha sido aislada a partir de la forma epimastigote de T.cruzi. De acuerdo a distintos trabajos en donde se correlaciona la capacidad protectora de anticuerpos con la presencia de anticuerpos líticos, solo la forma tripomastigote del parásito es capaz de generar anticuerpos líticos (119). Se ha sugerido que la forma tripo, pero no la forma epimastigote del parásito contiene un antígeno de 160 Kd, reconocida por sueros que contienen anticuerpos líticos, pero no por sueros que contienen anticuerpos anti T.cruzi incapaces de ejercer lisis de formas tripomastigotes. Este antígeno ha sido propuesto como candidato en ensayos de inmunoprotección (140). Es importante tener en cuenta que si bien la resistencia mediada por anticuerpos correlaciona con la presencia de anticuerpos líticos, esto no significa que este mecanismo parasiticida sea relevante en la resistencia contra T.cruzi.

Nuestros resultados sugieren que la utilización de antígenos de la forma epimastigote podría no activar mecanismos de respuesta inmune humoral asociados a la protección, e indican una diferencia entre los mecanismos de resistencia presentes en ratones protegidos por la inmunización con antígenos de epimastigotes y los de ratones crónicamente infectados

cuestionando la importancia de la respuesta inmune humoral en nuestro modelo de inmunoprotección experimental.

Los resultados presentados muestran que la inmunización protectora por FBp genera una respuesta inmune celular específica. Los ratones inmunizados y protegidos presentaron reacción cutánea de hipersensibilidad retardada, medida por la reacción cutánea en la almohadilla plantar. La naturaleza de esta reacción fue confirmada por la capacidad de las células de bazo de transferir la reacción cutánea. Esta respuesta celular correlaciona con la capacidad de las células de bazo de animales inmunizados con FBp de proliferar *in vitro* en respuesta a antígenos del parásito. La respuesta celular es específica y depende de la presencia del adyuvante, ya que la inmunización no protectora (con F sólo) no genera dichas respuestas.

Trabajos previos han demostrado que la inmunización con antígenos del parásito da lugar a una respuesta de inmunidad celular e hipersensibilidad retardada (2, 27, 137, 211, 213). La relación entre presencia de respuesta inmune celular y actividad protectora de un inmunógeno contra la infección con T.cruzi que demostramos, concuerda con resultados obtenidos utilizando otros antígenos del parásito (213, 216). Debemos destacar que B.pertussis además de ser capaz de inducir respuestas mediadas por células T, es administrada de rutina en la vacunación contra la tos convulsa, es decir se trata de un adyuvante inocuo en vistas a su utilización en el ser humano, en comparación con adyuvantes tales como Freund completo o incompleto, generalmente utilizados en modelos de inmunización experimental.

La inmunización con F-Bp inhibe la generación de la fase de inmunosupresión presente en la fase aguda de la infección con el parásito, hecho que fue demostrado por la presencia de respuesta de hipersensibilidad retardada y por la presencia de respuesta linfoproliferativa a ConA, ausentes en animales no inmunizados o inmunizados con antígenos no protectivos.

Nuestros datos sugieren una relación causa efecto entre la protección por inmunización con antígenos y la capacidad de evitar la inmunosupresión específica e inespecífica. Podría ocurrir que la depresión de los mecanismos específicos e inespecíficos de respuesta inmune resultara en una reducción de la capacidad del animal infectado para desarrollar o expresar respuestas protectoras. La relación entre la resistencia a la infección y los niveles de supresión de la respuesta inmune humoral ya había sido sugerida (250). Por otro lado una repetida estimulación antigénica con GRC antes de la infección con T.cruzi puede evitar la supresión de la respuesta a este antígeno durante la fase aguda. La manipulación experimental para neutralizar la inmunosupresión generalizada que la infección produce podría ser ventajosa para el huésped. La protección obtenida por la inmunización podría expandir células T no sensibles a los mecanismos de inmunosupresión, o bien podría activar mecanismos involucrados en la protección que, a través del control de la parasitemia, y la consiguiente disminución de carga antigénica podrían intervenir en la restauración de la respuesta inmune específica e inespecífica. Sin embargo una real evaluación de la importancia de la inhibición de la fase de inmunosupresión no

puede realizarse debido al desconocimiento del valor adaptativo de la misma en la evolución de la infección.

Los datos sugieren además la importancia de los mecanismos efectores independientes de la presencia de anticuerpos en el modelo de inmunoprotección utilizado.

El análisis de los resultados de transferencia de células presentados muestra que mientras que células de ratones crónicamente infectados son capaces de transferir protección frente al desafío con el parásito, el mismo número de células de animales inmunizados con FBp solamente transfiere la capacidad de controlar la parasitemia, indicando la presencia de diferentes mecanismos o antígenos reconocidos en ambas situaciones experimentales.

De esto se desprende la necesidad de desmenuzar tanto los mecanismos de resistencia como las estructuras reconocidas que permiten la resistencia del animal crónicamente infectado, como una estrategia válida en el desarrollo de métodos de inmunoprotección.

El desarrollo de vacunas contra parásitos está muy relegada con respecto al de vacunas contra infecciones bacterianas o virales. Causa de ello es la mayor complejidad genética de los parásitos que significa una mayor complejidad antigénica, así como una mayor flexibilidad adaptativa, que se expresa en diferentes mecanismos de evasión o escape de la respuesta inmune del huésped. Los avances en biotecnología que incluyen la posibilidad de cultivarlos *in vitro*, la obtención de anticuerpos monoclonales que permiten diseccionar antígenicamente el parásito y las técnicas de ADN recombinante, son utilizadas actualmente en

la comprensión de la biología de la infección parasitaria, así como en el desarrollo de vacunas contra parásitos protozoarios o helmintos.

Los resultados de los presentes y previos experimentos de inmunoprotección y aquellos en donde se demuestra la baja patogenicidad de la fracción flagelar, en comparación con la fracción microsomal cuya administración en ratones induce la aparición de miocarditis y miositis (206), han estimulado experimentos con el objeto de caracterizar antígenicamente dicha fracción. Para ello se han obtenido diferentes hibridomas productores de anticuerpos anti T.cruzi a partir fusiones utilizando células de bazo de ratones inmunizados con FBp (225). El empleo de metodología de ADN recombinante, por la utilización de bibliotecas de expresión ha permitido la caracterización de proteínas de superficie de T.cruzi (95, 122, 179). El conocimiento de la secuencia de estas proteínas podría ser utilizada para predecir regiones que contengan epitopes reconocidos por células T asociadas a la protección. El empleo de técnicas de biología molecular el desarrollo de elementos de inmunoprotección podría tener no solo un valor académico, sino también práctico debido a la imposibilidad de obtener grandes cantidades de antígeno por métodos tradicionales. De esta forma podrían obtenerse grandes cantidades de antígeno inmunoprotectivo. Utilizando esta estrategia se han obtenido resultados alentadores en un modelo experimental de infección con Schistosoma mansoni (11) y en los ensayos *in vivo* e *in vitro* realizados con péptidos de proteínas de Plasmodium falciparum (92, 286, 291). Sin embargo la aplicación de estas técnicas

carece de sentido sin el conocimiento de los mecanismos inmunológicos que participan en el control de la infección con el parásito.

Los resultados presentados apoyan la investigación y el desarrollo en este terreno, sobretodo si tenemos en cuenta que animales crónicamente infectados con T.cruzi, muestran una respuesta inmune, que si bien no es esterilizante, es capaz de inhibir o atenuar la reinfección por parásitos de T.cruzi de una cepa diferente a la original, es decir muestran inmunidad concomitante. La importancia de estudiar parámetros de respuesta inmune celular asociados a la protección también se desprende de nuestros resultados.

El papel de subpoblaciones de células linfoides en la resistencia natural a la infección con T.cruzi fue analizado en un modelo depleción in vivo de estas células por administración de anticuerpos contra marcadores presentes sobre su superficie. La administración de anti Thy1.2 redujo pero no eliminó la población de células T, medido por la respuesta a ConA de células de bazo de ratones tratados con estos anticuerpos. Trabajos previos en donde se observa un efecto similar del anti-Thy 1.2 mostraron que a pesar de la eliminación incompleta de células T, el tratamiento podía modificar el curso de una enfermedad autoinmune en la que intervienen células T, Thy 1.2 positivas (224), por lo que seguimos adelante en el estudio de la resistencia de animales así tratados. Utilizando ratones genéticamente atímicos, estudios previos de nuestro (228) y otros (113,105) laboratorios habían demostrado que las células T son de importancia en la resistencia contra infecciones subletales

con T.cruzi. Nuestros resultados utilizando ratones tratados con anti-Thy1.2 son coherentes con tales hallazgos. El tratamiento de ratones con anti Thy1.2 disminuye la resistencia a la infección con T.cruzi, indicando que las células T juegan un papel en la resistencia contra T.cruzi.

Las células T reconocen a un antígeno asociado a una proteína codificada por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Tanto las células T como las proteínas codificadas por el MHC se dividen en dos clases: células T CD4 positivas que reconocen antígenos asociados a moléculas MHC de clase II, y células T CD8 positivas que reconocen antígenos asociados a moléculas codificadas por el MHC de clase I. Las células T CD4 positivas son las llamadas células helper o colaboradoras en la síntesis de anticuerpos. Por su capacidad de sintetizar distintos tipos de linfoquinas y por la densidad de marcadores de membrana, se pueden dividir en dos subtipos. Solo una de estas subpoblaciones participa claramente colaborando en la síntesis de anticuerpos específicos. Esta subpoblación sintetiza IL-4, linfoquina necesaria para la síntesis de IgE y de IgG1, e IL-5 que interviene en la respuesta primaria específica y en la fase de activación y diferenciación de las células B. La otra subpoblación de células T CD4 positivas interviene en respuestas inflamatorias, siendo capaz de ejercer actividad citolítica, sintetizar IL-2, interferón γ , o linfo toxina, y sería la responsable de la activación de los macrófagos para la destrucción de los parásitos intracelulares. Estas células también participan en el cambio de síntesis de IgG1 a IgG2a por células B activadas por IL-4. Células de esta subclase, pueden

además tener una función supresora. En resumen, esta diferenciación funcional podría haber surgido con el objeto de mediar diferentes tipos de respuesta inmune protectora, incluyendo la actividad de las células colaboradoras en la síntesis de anticuerpos que participan en la respuesta defensiva extracelular y las T inflamatorias activas en la respuesta a microorganismos intracelulares.

El tratamiento *in vivo* con anti L3T4.GK15 deplecionó a la subpoblación L3T4 positiva, provocando la inhibición completa de la inducción de células formadoras de anticuerpos IgM o IgG contra GRC, que depende de células T colaboradoras. Se mostró en trabajos previos que el tratamiento con anti L3T4 también bloquea la formación de anticuerpos contra antígenos solubles o particulados (223, 280, 281) lo que indica que es un marcador específico de células T colaboradoras.

El tratamiento con anti-L3T4 también bloqueó en nuestras manos la generación de anticuerpos IgG específicos anti-T.cruzi medidos en un ensayo de ELISA. Así hemos demostrado *in vivo* que la generación de anticuerpos anti-T.cruzi es dependiente de células T colaboradoras. Otros autores habían sugerido que *in vitro* células T colaboradoras se activan durante la infección con T.cruzi y que estas células inducen respuestas carrier-específicas (29, 254).

La depleción de células L3T4 positivas por administración de anti L3T4 a ratones de las cepas BALB/c o C57B1/6 resulta en una mayor susceptibilidad a la infección.

Por otro lado se ha demostrado la capacidad de transferir resistencia por suero de animales crónicamente infectados, lo que

indica un papel de los anticuerpos en la protección. En concordancia con estos resultados ratones seleccionados genéticamente por su baja capacidad de síntesis de anticuerpos (112), o tratados neonatalmente con anti IgM (263), que produce una inhibición en la diferenciación de las células B, son más susceptibles a la infección con T.cruzi.

Hemos demostrado que células L3T4 positivas juegan un papel en la resistencia y que células del mismo fenotipo participan en la formación de anticuerpos específicos anti-T.cruzi. El conjunto de los datos presentados con los recientemente discutidos sugiere que las células L3T4 positivas tienen un papel en la resistencia a través de su actividad colaboradora en la síntesis de anticuerpos asociados a la protección. Sin embargo las células T L3T4 positivas pueden mediar funciones efectoras diferentes a la cooperación con células B para la formación de anticuerpos específicos. Estas funciones incluyen la producción de linfoquinas capaces de activar células NK, macrófagos y a otros fagocitos y participar en la diferenciación de células citotóxicas CD8 positivas capaces de destruir células infectadas por T.cruzi. También ha sido descrita la actividad citotóxica mediada por células L3T4 positivas (289). La heterogeneidad funcional de células L3T4 positivas ha sido demostrada en un modelo de infección experimental con Leishmania major, en donde están asociadas a la protección, pero también a la susceptibilidad a la infección, estando la evolución de la infección determinada por el balance entre diferentes subclases de células T L3T4 positivas. Recientes estudios en modelos de infección experimental con T.cruzi han demostrado que estas

células intervienen en la fase de activación policlonal que conduce a la generación de células B productoras de anticuerpo, así como en la respuesta blastogénica de células B (111). En animales crónicamente infectados, dichas células participarían en la respuesta inmune concomitante. Clones y líneas de células T L3T4 positivas, obtenidas de ratones en esta fase de la infección, tienen actividad protectora (165). Células del mismo fenotipo provenientes de ratones infectados crónicamente son capaces de inducir demielinación, en forma restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (287). Dichas células son capaces de transferir hipersensibilidad retardada a antígenos del parásito o antígenos de nervio periférico (287). Resumiendo nuestros resultados apuntan a la necesidad de considerar en el desarrollo de elementos de inmunoprotección contra el T.cruzi a las células L3T4 positivas, tanto en su funcionalidad como en su especificidad antigénica.

La participación de células T, CD8 positivas en la resistencia a la infección contra T.cruzi no ha sido estudiada. A pesar de ello células capaces de ejercer citotoxicidad directa han sido descritas en animales infectados con Trypanosoma cruzi o pacientes chagásicos (10, 288). La participación de dichas células ha sido demostrada en mecanismos efectores de resistencia en infecciones con bacterias intracelulares o protozoarios como en el caso de Theileria parva (289). Estudios recientes de distintos autores evidencian el papel protector de células CD8 positivas en la infección con Plasmodium yoelii (151) y Leishmania major (260). La actividad de estos linfocitos al reconocer células que presenten antígenos de T.cruzi asociados

con moléculas de histocompatibilidad de clase I podría conducir a un control de la infección, ya sea por la posibilidad de presentar parásitos intracelulares a mecanismos efectores de destrucción extracelulares, o por la destrucción misma de los parásitos. La actividad de células T CD8 positivas también podría deberse a su capacidad de síntesis de IFN- γ como se ha demostrado en un modelo de inmunización protectora contra Plasmodium berghei (221). Estos trabajos tienen importancia porque al demostrar el papel de células CD8 positivas en la resistencia a la infección con diferentes parásitos, o bacterias intracelulares echan por tierra el dogma de que solo antígenos endógenos (los sintetizados por la maquinaria de una célula presentadora de antígeno) pueden asociarse con moléculas de histocompatibilidad de clase I. Antígenos exógenos (que incluyen bacterias, parásitos intra y extracelulares o moléculas inmunogénicas) según aquel dogma se asociarían con moléculas de histocompatibilidad de clase II por lo que solo serían reconocidas por linfocitos CD4 positivos (102).

La destrucción de la célula parasitada, podría ser, por otro lado, uno de los mecanismos de la patogenia de la enfermedad. El reconocimiento y destrucción de células que presenten antígenos propios que comparten determinantes antigénicos con el T.cruzi o que presenten en superficie antígenos de T.cruzi liberados por la destrucción del parásito (10, 63, 64) podría estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad. Se ha observado la presencia de antígenos del huésped que presentan reacción cruzada con los del parásito (236, 244, 246, 283). Si bien muchos de estos trabajos se han basado en

la capacidad de reconocimiento por anticuerpos específicos, también ha sido descrito en la infección con T.cruzi el reconocimiento (41) y destrucción de miocitos normales o células que presenten antígenos del parásito en superficie, por parte de linfocitos sensibilizados (3,10,63). La destrucción de miocitos normales podría producirse no solo por el reconocimiento de antígenos del parásito en su superficie o de determinantes antigénicos del miocito con reacción cruzada con los del parásito, sino también debido a que la destrucción de células parasitadas conlleva la presentación a la respuesta inmune de antígenos propios que habitualmente no son inmunogénicos. La actividad lítica parece estar llevada a cabo por células T no restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad (94). La destrucción de la célula parasitada podría contribuir también a la dispersión del parásito en diferentes tejidos y órganos. Teniendo estos antecedentes en cuenta, el estudio del papel de células T citotóxicas CD8 positivas en la infección es relevante, tanto desde el punto de vista de los mecanismos inmunes de defensa como de la patogenia de la enfermedad.

A pesar de que las respuestas mediadas por fagocitos y células T parecen regular muchos de los aspectos de la respuesta inmune celular anti parasitaria, otras células pueden ser importantes en la protección. Se ha demostrado en el presente estudio que las células NK juegan un rol en el control del parásito en la fase aguda de una infección con T.cruzi. En el mismo modelo de administración de anticuerpos *in vivo* hemos utilizado dos anticuerpos diferentes que reconocen a células NK: anti asialo GM-1 y NK 1.1. La administración de estos

anticuerpos produjo la depleción de la actividad NK medida por la lisis de células de la línea YAC-1, aún cuando los esplenocitos de los ratones tratados fueron estimulados con interferón α - β .

Ambos anticuerpos habían sido utilizados anteriormente en el estudio *in vivo* del papel de las células NK (81,222).

Anti-asialo GM-1 es muy eficiente en la eliminación de la actividad NK, pero recientemente se ha demostrado que esta presente, aunque en menor grado en macrófagos activados (277) y en células T citotóxicas (242). El antígeno NK 1.1 es un marcador mucho más exclusivo. Es un marcador alotípico presente en células que median actividad NK de ratones de la cepa C57B1; está ausente de la superficie de células B, T, macrófagos y otros fagocitos (117,222).

En nuestras manos ratones BALB/c tratados con anti asialo GM-1 o C57B1/6 tratados con anti NK1.1 mostraron en nuestras manos mayor susceptibilidad a la infección con T.cruzi .

Estudios previos mostraron que la resistencia contra la infección con T.cruzi no aumentaba cuando se trataban ratones beige (deficientes en actividad NK y con deficiencias en la actividad de lisosomas) con tilorone, inductor de interferón de tipo I que aumenta la resistencia a la infección de ratones congénitos normales (98). En nuestro modelo experimental el tratamiento con interferón α - β , que aumenta la actividad natural killer (72), también aumentó la resistencia a la infección, indicando que células NK participan en el control de la infección. Sin embargo, se ha mostrado que ratones beige no son más susceptibles a la infección con T.cruzi que los ratones normales (86).

Los experimentos realizados no establecen si las células NK están involucradas en el control de la infección por su función efectora, o regulando, por su capacidad de síntesis de interferón γ el potencial citotóxico de células fagocíticas.

En el presente estudio hemos caracterizado además el fenotipo de subpoblaciones células de bazo de ratones crónicamente infectados capaces de transferir resistencia a la infección. La depleción de células B o células adherentes de las poblaciones linfoides por adherencia a lana de nylon, Sephadex-G10, o adsorción a anticuerpos anti IgG de ratón unidos a un soporte sólido, no modificó la capacidad de transferir resistencia, indicando que las células T son capaces de transferir protección. La depleción de células T de bazo por tratamiento con anti Thy1.2 y complemento o de las subpoblaciones L3T4 o Lyt2.2 positivas por el mismo método tampoco eliminó la capacidad de transferir resistencia, indicando que, probablemente, las células B también median esta actividad. Se observó una reducción en la capacidad de transferencia de resistencia por células de bazo deplecionadas de células T. Sin embargo el valor de esta diferencia no es, al momento, clara. Nuevamente surge el concepto de que la resistencia a T.cruzi se debe a la actividad cooperativa de diferentes subpoblaciones celulares. En conclusión, los resultados de transferencia indican que tanto células B, como células T (que podrían actuar como colaboradoras en la síntesis de anticuerpos y/o activando mecanismos independientes de anticuerpos), median la resistencia contra el parásito en ratones crónicamente infectados.

La diversidad de elementos celulares y mecanismos efectores de destrucción que este y otros trabajos postulan, guarda una estrecha asociación evolutiva con las características biológicas del parásito. La condición de parásito intracelular facultativo descartaría así el control de la infección por mecanismos inmunes que actúen solamente sobre la forma extracelular (tripomastigote). Por otro lado el T.cruzi es capaz de parasitar células fagocíticas profesionales y no profesionales que presentan diferencias en cuanto a la capacidad de controlar la infección o responder a linfoquinas. En los macrófagos es capaz de evadirse de la destrucción, escapando del fagolisosoma al citoplasma, en donde es capaz de multiplicarse. La activación del macrófago por linfoquinas lo hace capaz de destruir al parásito intracelular. Sin embargo estos mecanismos de activación no convertirían en hostiles al parásito a fagocitos no profesionales. En este caso podrían tener relevancia mecanismos como ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) contra células que expresen antígenos del parásito en la superficie, citotoxicidad directa mediada por CTL (linfocitos T CDB positivos), actividad de células T citotóxicas específicas no restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad o de células LAK o NK. Se ha sugerido además que miocardiocitos de ratón (células fagocíticas no profesionales) son capaces de inhibir la multiplicación de los amastigotes intracelulares, luego de ser tratados por linfoquinas sensibles al tratamiento a pH 2 (192).

Esto indica que no debería descartarse la actividad de linfoquinas en el control de la infección sobre células no

8: BIBLIOGRAFIA

- 1) Abrahmsohn I.A., Blotta M.H.S.L., Curotto M.A. 1983. Specific cutaneous hypersensitivity responses in mice infected or immunized with Trypanosoma cruzi. Paras.Immunol. 5: 237
- 2) Abrahmsohn I.A., de Oliveira L.C., Curotto M.A., C. de Lima G.M. 1987. T cell responses in mice infected and immunized with Trypanosoma cruzi. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 82: 336
- 3) Acosta A.M., Santos-Buch C.A. Autoimmune myocarditis induced by Trypanosoma cruzi. Circulation 71 (6): 1255
- 4) Alarcon Segovia S. y col. 1974. Immunology of Chagas' disease. Bull.WHO 50: 459
- 5) Albright J.A., Hatcher F.M., Albright J.F. 1984. Interaction between murine natural killer cells and trypanosomes of different species. Infect.Immun. 44: 315
- 6) Andersson J., Gronvik K.O., Larsson E.L., Coutinho A. 1979. Studies on T-lymphocyte activation. I. Requirements for the mitogen dependent production of T-cell growth factors. Eur.J.Immunol. 9: 581
- 7) Andrade Z.A. 1983. Mechanisms of myocardial damage in Trypanosoma cruzi infection. En Cytopathology of Parasitic diseases (CYBA Foundation Symposium 99) London Pitmann Books: 214
- 8) Andrade Z.A., Andrade S.G. 1972. Anatomía patológica: Cardiopatía chagásica. Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Buenos Aires
- 9) Andrade Z.A., Andrade S.G., Sadigursky M. 1987. Enhancement of chronic Trypanosoma cruzi myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. Am.J.Pathol. 127: 467
- 10) Araujo F.G. 1985. Trypanosoma cruzi: Expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. J.Immunol.135(6): 4149

fagocíticas. Por otro lado la inducción de la síntesis de antígenos de histocompatibilidad de clase I sobre células infectadas por acción de interferón de tipo I podría aumentar la susceptibilidad de las células infectadas a la actividad de células citotóxicas.

Queda por discernir la importancia relativa de cada uno de estos mecanismos inmunológicos, y elementos celulares en el control de la infección utilizando diferentes combinaciones cepa de parásito-cepa de huésped, así como su posible papel en la patogenia de la enfermedad.

Las alteraciones producidas en el huésped por la infección por T.cruzi modifican la funcionalidad de los mecanismos efectores de la protección. Así el análisis de los mecanismos inmunológicos de resistencia debe considerarse teniendo en cuenta las alteraciones del sistema inmunológico. Hemos analizado en el marco de la resistencia a la infección las alteraciones en la producción y respuesta a linfoquinas durante la fase de activación policlonal e inmunodepresión de la fase aguda de la infección de ratones BALB/c.

Se observó en el presente estudio una importante proliferación blástica por células de bazo de ratones en la infección temprana con el parásito (4-7 dpi), sin el agregado de antígenos o mitógenos al medio de cultivo. La cinética e intensidad de la misma sugieren que existe un mecanismo independiente del reconocimiento de determinantes antigénicos específicos del parásito, en otras palabras un mecanismo independiente de la señal dada por el reconocimiento de un antígeno del parásito a través del receptor antígeno específico.

La activación policlonal en cuanto a la presencia de actividad blástica había sido descrita en trabajos previos (148). Una de las explicaciones del gatillado de la activación policlonal podría ser la presencia de estructuras mitogénicas (como lipopolisacárido) descritas sobre la superficie del parásito (75). Las células T y B sufren esta activación policlonal, que se acompaña de la diferenciación de dichas células en células productoras de inmunoglobulinas, efectoras de citotoxicidad o colaboradoras en la síntesis de anticuerpos (147, 148, 149, 174).

Hemos demostrado que entre el 4 y el 7 pi y concomitantemente con el aumento de la proliferación celular "espontánea", las células de bazo producen interleuquina 2 sin el agregado de antígenos o mitógenos. Por depleción de subpoblaciones celulares con anticuerpos monoclonales y complemento, vimos que las células productoras de IL-2 son linfocitos T, Lyt1.2 positivos. El fenotipo L3T4 positivo de la célula T productora de IL-2, concuerda con el determinado anteriormente en otra situación experimental (197).

Ha sido recientemente descrito el papel de las células L3T4 positivas en la activación policlonal B (149). Sin embargo esta subpoblación de células colaboradoras podría no sintetizar IL-2, por lo que este trabajo se constituye en la demostración de la activación funcional de esta subclase de células Lyt1.2 positivas durante la infección por T.cruzi.

Observamos que la cinética y nivel de producción de IL-2 varía según la dosis infectiva utilizada. Así, al 4 dpi células de bazo de ratones infectados con un bajo número de parásitos

sintetizan más IL-2 que las provenientes de animales infectados con un mayor inóculo. Al 8 dpi los esplenocitos de ratones infectados con alto número de parásitos no producen IL-2. Estos resultados indican que la síntesis de IL-2, una vez iniciada, termina más temprano durante la infección con altas dosis de parásitos.

La expresión de receptores de IL-2 fue detectada al 4 dpi en células de bazo de ratones infectados. Por depleción con anticuerpos contra marcadores celulares de superficie, vimos que esta expresión depende de la presencia de células T, Lyt 2.2. negativas en el cultivo, y se observa en células de bazo de ratones infectados con altas o bajas dosis de parásitos. En el análisis de la expresión del receptor de IL-2 o producción de IL-2 por esplenocitos de ratones infectados con 1 parásito, se debería tener en cuenta que juntamente con los parásitos, se podrían inocular células conteniendo parásitos intracelulares o antígenos del parásito, que pueden ser parcialmente responsables de las alteraciones del sistema inmune encontradas.

La producción de IL-2 y la expresión del IL-2 R son muy probablemente mecanismos mediadores de la activación policlonal de células T y B que se observa en la fase temprana de la infección experimental. La IL-2 es mediador de las fases de activación, proliferación y diferenciación de células T (234). También participa en la fase de activación y proliferación de células B y puede activar el potencial citotóxico de células NK.

La actividad NK se encuentra aumentada durante esta etapa de la infección (86). Las células activadas por IL-2 (lymphokine activated cells:LAK) podrían tener un papel efector

en la destrucción del parásito o de células parasitadas. Estas células son efectoras de la lisis celular en forma no restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (89). Con mayor espectro y efectividad de lisis que las células NK, dichas células generadas *in vitro* por estimulación de células linfoides con IL-2, han sido utilizadas para el tratamiento de ratones o pacientes afectados con distintos tipos de tumores (89,156). No ha sido aún estudiada la posibilidad de que estas células reconozcan y destruyan células con antígenos de T.cruzi en su superficie, y tengan un papel relevante en el control de la infección con T.cruzi.

Si bien la relevancia biológica de la fase de activación policlonal en la evolución de la infección no es clara, una alteración tan drástica y veloz de los componentes celulares tiene con alta probabilidad implicancias en los mecanismos de resistencia y patogénesis de la Enfermedad de Chagas. Los hallazgos descritos en el presente trabajo deberían ser tenidos en cuenta en una eventual modulación experimental de esta fase con fines inmunoproliféricos. El estudio de consecuencias de la activación policlonal en modelos de autoinmunidad o de infecciones virales son también relevantes para encarar futuros trabajos. En este sentido se ha evidenciado en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes sistémicas, no son consecuencia de una activación de clones de células B autorreactivas sino de una activación policlonal sistémica (290).

La fase de activación policlonal es seguida por una fase de inmunodepresión, que es muy probablemente consecuencia de la primera. Se ha observado en el presente trabajo que células de

bazo muestran una reducida capacidad para proliferar y producir IL-2 en respuesta a ConA desde el 14 hasta el 28 dpi. Esta capacidad se restaura en la fase crónica de la infección, donde las células también responden proliferando y produciendo IL-2 en presencia de antígenos de tripomastigotes en el cultivo. Estos resultados confirman trabajos anteriores que muestran con otras combinaciones de cepa de ratón-cepa de parásito, el defecto en la proliferación y en la producción de IL-2 (83, 84). Durante la fase crónica, las células de bazo proliferaron y produjeron IL-2 en respuesta a la estimulación con antígenos de la forma tripomastigote de T.cruzi.

Durante la fase aguda, el agregado de IL-2 fue incapaz de restaurar la respuesta linfoproliferativa a Con A (16, 83), indicando que la falla no se debe solamente a la falta de producción de la linfoquina, sino también a un defecto en la respuesta a la misma.

En el presente trabajo se muestran resultados que pueden explicar esta incapacidad de respuesta a IL-2: Una deficiente expresión de los receptores de IL-2 por células de bazo de ratones infectados (21 dpi), luego de la estimulación con Con A. Esta deficiencia fue confirmada en diferentes protocolos experimentales: en un ensayo de competencia utilizando el ligando IL-2 recombinante iodinado, en un análisis de inmunofluorescencia por FACS utilizando un anticuerpo monoclonal anti el receptor de IL-2 murino, así como en ensayos funcionales.

Receptores de alta y baja afinidad presentes en la superficie celular son capaces de unirse a IL-2 (235). El análisis de Scatchard de los resultados del ensayo de competencia

muestra una deficiente expresión de los IL-2R de alta y baja afinidad. Cuando se detectaron receptores, la afinidad de los mismos fue semejante a la de los expresados por células de animales normales. El análisis mostró que en algunos animales se produce la eliminación total de receptores de baja afinidad y la reducción de los de alta afinidad, mientras que en otros no hemos detectado ningún tipo de receptor, lo que sugiere que en este sistema, los receptores de baja afinidad serían los primeros en ser modulados por efecto de la infección. Su eliminación total sería seguida por la eliminación de los receptores de alta afinidad, ya que también son constituyentes de este complejo. Una modulación diferencial de ambos tipos de receptores, ha sido sugerida en la respuesta a antígenos o a IL-2 (138).

El ensayo funcional de esta deficiencia de expresión fue llevado a cabo midiendo la respuesta proliferativa a IL-2, por blastos de ConA de 48h, provenientes del cultivo de células de bazo de ratones infectados (21 dpi) o no. Los blastos de animales infectados mostraron una menor respuesta proliferativa a IL-2 que los de provenientes de animales controles. Se consideró que las células estimuladas por IL-2 fueron blastos debido a que la capacidad de proliferación de las mismas en respuesta a ConA, si bien está disminuida, no está ausente. Además el análisis fenotípico de las células estimuladas por Con A no muestra una reducción del componente T entre los esplenocitos provenientes de ratones infectados. Este análisis fenotípico realizado utilizando anticuerpos contra marcadores de superficie, confirma que la deficiente expresión de IL-2R no se debe a la eliminación de las subpoblaciones de células T. Sin embargo, existe una discordancia

con otros autores que describen una variación en la composición de subpoblaciones linfoides durante la infección con T.cruzi (108). La ausencia de reducción de las poblaciones T del bazo de animales infectados también fue descripta en ratones infectados con la cepa Y o CL (84).

Recientemente se indicó que la infección con Trypanosoma brucei causaba una deficiencia en la expresión del receptor de IL-2 (233), lo que sugiere que se trataría de un mecanismo común en por lo menos algunas infecciones parasitarias.

La deficiencia en la producción de IL-2 y en la expresión de su receptor podrían deberse a alteraciones provocadas por la infección, sobre la capacidad de activación de las células T. Esta alteración podría ser directa, debido a la actividad de proteasas (20) o glicosidasas (55) existentes en el parásito sobre receptores de los linfocitos T (por ejemplo el receptor a Con A o el IL-2R), o indirecta por modificación de la capacidad funcional de enzimas como la proteína quinasa C, la fosfodiesterasa o la calmodulina, involucradas en la activación celular (97). La actividad de células o factores supresores también podría explicar la deficiencia en la respuesta inmune celular. Análisis realizados por dilución límite indican que la inmunodepresión se debe tanto a una falla en la funcionalidad de células T como a la presencia de células o factores supresores (84). La elucidación de los niveles en los que la capacidad funcional de las células T se encuentra bloqueada podría estudiarse mediante el uso de algunos activadores celulares tales como el forbol miristil diacetato (PMA), el ionóforo de calcio, o de sondas de ARN mensajero del receptor de IL-2. Experimentos en

este sentido podrán elucidar si el defecto descrito es inherente a la funcionalidad celular, debido a la falta de receptores al mitógeno en la superficie de la célula T, a un defecto en la transducción de la señal, o una falla en una fase posterior a la transducción de la señal. Es improbable que el defecto observado se deba al bloqueo en la diferenciación de los precursores de las células T que responden a ConA, ya que hemos detectado marcadores presentes en células T diferenciadas sobre esplenocitos de ratones infectados en la fase aguda de infección.

La falta de respuesta a ConA, producción de IL-2 y expresión del receptor ha sido detectado en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes. Al igual que en nuestro modelo el significado biológico de este defecto en el contexto de la enfermedad se desconoce. La aparición de anticuerpos autorreactivos es independiente de este defecto, que se expresa aproximadamente al mismo tiempo que los síntomas clínicos de la enfermedad (292).

Hemos detectado la presencia de factores solubles liberados por células de bazo de animales infectados durante la etapa de inmunodepresión, de PM aproximado entre 50 y 150 Kd (determinado por filtración molecular en HPLC), capaces de inhibir la proliferación de células CTL.L. Estos factores actúan en forma dosis dependiente y no compiten con la IL-2 por su receptor celular. Son factores tóxicos selectivos, ya que algunas líneas celulares no son afectadas por su actividad.

Recientemente, se observó la presencia de factores solubles capaces de inhibir la inducción de reacciones de hipersensibilidad retardada, en sobrenadantes de cultivos de

células de bazo de ratones infectados al día 28 pi (130). Estos factores tampoco fueron antígeno específicos. En coincidencia con nuestros resultados, los autores muestran que este factor(es) tiene un PM de entre 30 y 60 Kd, y presenta también actividad en forma agregada (131).

Estudiamos el efecto de los productos de la vía de la ciclooxigenasa sobre la depresión de la respuesta a ConA y la producción de los factores inhibitorios de la proliferación celular. Los resultados presentados indican que la respuesta a Con A en la fase aguda de la infección no se restaura por el bloqueo de la vía de la ciclooxigenasa. Por otro lado, los factores descritos que bloquean la proliferación celular están presentes cuando se agrega indometacina al cultivo, sugiriendo que las prostaglandinas no estarían implicadas en la síntesis de los mismos. Confirmando resultados previos, se descartaría un efecto supresor por las prostaglandinas liberadas por los macrófagos en la inhibición de la respuesta a Con A (84, 107). Sin embargo, no debe descartarse el papel de las prostaglandinas en otras fases o mecanismos inmunológicos que actúan durante la infección (34).

El suero de ratón normal presenta factores capaces de inhibir la proliferación de líneas celulares dependientes de IL-2 (82). En el presente trabajo se confirman estas observaciones. Además, demostramos que el suero de ratones en la fase de inmunodepresión (21 dpi) tiene aumentada la capacidad de inhibir la proliferación de la línea CTL.L, dependiente de IL-2. El aumento de esta capacidad inhibitoria había sido descrito en sueros de ratones infectados experimentalmente con Plasmodium

berghei y Plasmodium yoelii (128), y en sueros de pacientes de SIDA (62). Estos experimentos no aclaran si los factores séricos supresores presentan la misma naturaleza que los factores liberados por esplenocitos de animales infectados.

Si bien este y otros trabajos demuestran la presencia de factores solubles con capacidad supresora, no se conoce el papel in vivo de estos factores. Experiencias en las que se determine in vivo el efecto biológico de los factores purificados o la utilización de anticuerpos con capacidad de neutralizar in vivo o in vitro su actividad, podrán elucidar el papel de estos factores en la evolución de la infección y en particular su importancia en la generación de la fase de inmunodepresión. La demostración de factores supresores solubles o fallas en la funcionalidad celular, pueden explicar no solamente la falta de respuesta a un mitógeno sino la inmunodepresión específica en la fase aguda de la infección en un momento en que grandes cantidades del parásito, pero también de componentes celulares propios son expuestas al reconocimiento inmune.

Estudiamos la relevancia in vivo, y en el contexto de la resistencia a la infección, de los hallazgos observados in vitro.

La administración in vivo de IL-2 no aumentó la resistencia a la infección experimental.

La administración de IL-2 por diferentes vías, en presencia o no de adyuvante incompleto de Freund, y en diferentes cepas de ratones, no tuvo efecto sobre la susceptibilidad del ratón a la infección. Las experiencias in vitro detalladas previamente, así como la falta de respuesta a IL-2 descrita por otros autores (83) pueden justificar esta falta de respuesta a

dosis de IL-2 que tienen actividad biológica en otros modelos experimentales (262). En contraposición con estos resultados Choromansky y Kuhn (51), han mostrado que la administración de dosis de IL-2 menores a las utilizadas en el presente estudio tiene un efecto protectorio.

Experimentos *in vitro* habían mostrado la incapacidad de IL-1 de restaurar la respuesta proliferativa a Con A de células de bazo durante la fase aguda de la infección por T.cruzi (83). Vimos que la administración de IL-1 no aumentó la resistencia a la infección.

En contraste con estos resultados, la administración de interferón γ día por medio del -1 al 14 pi disminuyó la susceptibilidad a la infección en términos de parasitemia y mortalidad. Este efecto fue dependiente de la dosis de interferón administrada. Además la administración de una sola dosis de 10^5 unidades de interferón γ , dosis capaz de activar macrófagos *in vivo* (160), 24 h antes de la infección, también produjo un efecto protectorio. Estos resultados coinciden con aquellos presentados por Plata y colaboradores (181), así como con experiencias de administración de interferón en la infección experimental con Leishmania donovani o Toxoplasma gondii (161,141). El interferón- γ es capaz de activar la capacidad tripanocida de macrófagos (182, 279). La destrucción del parásito por el macrófago activado por interferón γ depende de la producción de radicales libres de oxígeno (279). En el caso de la infección con T.gondii el interferón γ es mediador de mecanismos de control del parásito, ya que la administración *in vivo* de anticuerpos monoclonales anti interferón γ , resulta en un aumento de

susceptibilidad al parásito (243). En un modelo de infección experimental de ratas con Plasmodium berghei el tratamiento con anti interferón τ resultó en la pérdida de la inmunidad protectora adquirida por la infección con parásitos inactivados por irradiación (221).

Así, si bien la respuesta a IL-2 es deficiente la respuesta a interferón τ resulta en la activación anti tripanosomal de células de animales infectados. Sin embargo, no existen estudios del efecto del tratamiento con interferón τ utilizando diferentes esquemas, dosis o vías de administración. Nuestros resultados apoyan esta línea de investigación, cuyos resultados podrán abrir las puertas a una eventual utilización de esta linfoquina en la inmunoterapia de la infección, o como acompañante de quimioterapia en el enfermo de Chagas agudo o congénito.

En nuestras manos, la administración de interferón α - β también protegió a los ratones de la infección experimental con T.cruzi. A diferencia de los resultados presentados por Sonnenfeld y colaboradores (240), que describen la protección en términos de parasitemia solamente, la administración de esta citoquina día por medio del día -1 al 13 pi protegió a los ratones en términos de parasitemia y de mortalidad.

Estos trabajos indican la actividad de células NK en la modulación de la resistencia a la infección por interferón de tipo I (98). El interferón α - β también protege al inocularse entre el día previo y el día 3 pi, pero no después del día 5 pi, indicando la intervención de células NK en las etapas tempranas de la infección. Además se ha demostrado que los ratones mutantes en el locus BXH-2 que presentan susceptibilidad a la infección

con T. cruzi a niveles comparables con los de animales atímicos, carecen de producción de interferón de alfa/beta en la fase temprana de infección, a pesar de que los títulos de anticuerpos específicos son similares a los de los ratones congénicos normales (266).

En resumen, se han caracterizado parámetros de respuesta inmune celular y subpoblaciones celulares intervinientes en la resistencia y se ha relacionado estos elementos con las alteraciones de la respuesta inmune inducidas por la infección. Se ha comenzado con la caracterización a nivel molecular y celular de dichas alteraciones sobretodo en el compartimiento T del sistema, tratando de elucidar su papel en el contexto de la resistencia a la infección. El presente trabajo indica una relación entre la resistencia y las alteraciones del sistema inmune que se registran durante la infección por Trypanosoma cruzi. Indica además que la resistencia a la infección esta dada por la actividad de diferentes células y mecanismos inmunológicos en forma sinérgica, tanto en ratones normales como participando en mecanismos de inmunidad concomitante.

Queda por aclarar la importancia relativa de las distintas alteraciones descritas en células T de ratones infectados en la resistencia a la infección, la relación que presentan las mismas con la patogénesis de la Enfermedad de Chagas, y sobre todo el papel adaptativo de las mismas en el contexto de la relación huésped-parásito.

Se ha demostrado que la respuesta inmune celular es modulada tanto por la infección como por la inmunización con antígenos del parásito. La caracterización de parámetros de respuesta inmune

celular y su relación con la protección, apoya investigaciones tendientes a la búsqueda de elementos de inmunoprotección e inmunoterapia, además de resultar en una mayor comprensión de la biología de la infección con Trypanosoma cruzi.

7: CONCLUSIONES

1. La inmunización con la fracción F-Bp de T.cruzi genera una respuesta inmune celular específica que depende de la presencia del adyuvante y que esta asociada con el grado de protección que confiere dicha inmunización.

2. Células de bazo y suero de animales crónicamente infectados transfieren resistencia a la infección con el parásito. La población de esplenocitos enriquecidos en células T también transfiere protección. Esplenocitos de animales inmunizados con F-Bp, transfieren capacidad de controlar la parasitemia, pero no la mortalidad mientras que el suero no transfiere resistencia a pesar de los altos títulos de anticuerpos específicos.

3. La inmunización con F-Bp impide la generación de una fase de inmunodepresión característica de la infección con Trypanosoma cruzi.

4. La depleción de células T colaboradoras, inhibe la generación de células formadoras de anticuerpos específicos contra antígenos de Trypanosoma cruzi en animales inmunizados con los mismos.

Asimismo esta depleción aumenta significativamente la susceptibilidad a la infección experimental.

5. Las células con actividad NK participan en la resistencia natural contra la infección experimental. La depleción de dicha población celular aumenta la susceptibilidad a la infección de los ratones.

6. Durante la fase de activación policlonal inducida por la infección experimental, en correlación con la proliferación celular, células T, Lyt 1.2 positivas, producen IL-2, sin el agregado de antígenos o mitógenos al cultivo. Esta producción depende de la dosis infectiva utilizada. Células T, Lyt 2.2 negativas expresan durante esta etapa al receptor de IL-2.

7. En etapas tardías de la fase aguda de la infección se observa un estado de inmunodepresión. En correlación con una disminuida respuesta linfoproliferativa a Con A, hay una baja producción de IL-2 en respuesta al mitógeno. También durante esta fase, las células de bazo presentan bajos o nulos niveles de expresión del receptor de IL-2 en respuesta a ConA. El análisis de Scatchard muestra la desaparición de receptores de baja afinidad y la disminución de los de alta afinidad en los individuos en los que fue detectada la expresión del receptor.

8. Factor/es soluble/s de 50 y 150 Kd aproximadamente fueron liberado/s por células de bazo de ratones en la fase de inmunodepresión, e inhibe/n la proliferación celular, en forma independiente del sistema interleuquina 2. Un aumento de la capacidad inhibitoria de la proliferación de células dependientes de IL-2 presente en el suero de ratón normal fue determinada en el suero de ratones durante esta fase de la infección.

9. De acuerdo con los resultados in vitro , la administración in vivo de IL-2 o IL-1 recombinante, no aumenta la resistencia a la infección experimental. En cambio el tratamiento con interferón α - β o interferón γ aumenta, la resistencia a la infección en forma dosis dependiente .

10. El tratamiento con indometacina no restaura la capacidad de respuesta a ConA de células de bazo de ratones al 21 dpi, ni inhibe la actividad o producción de factores inhibidores de la proliferación celular.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Segura', followed by a large, sweeping horizontal stroke underneath.

11) Balloul J.M., Sondermeyer P., Capron M., Gryzch J.M., Pierce J.R., Carvalho D., Lecocq J.P., Capron A. 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* 326: 149

12) Barousse A.P., Coppola S., Costa J.A., Laplume H. 1978. Enfermedad de Chagas e inmunosupresión. *Medicina (Buenos Aires)* 37: 428

13) Barousse A.P., Costa J.A., Eposto H., Laplume H., Segura E.L. 1980. Enfermedad de Chagas e inmunosupresión. *Medicina (Buenos Aires)* 40(supl 1): 17

14) Barousse A.P., Eposto M.O., Mandel M., Sousa Martinez F. 1978. Enfermedad de Chagas congénita en area no endémica. *Medicina (Buenos Aires)* 38: 611

15) Barret T.V., Hoff R.H., Mott K.E., Guedes F., Sherlock I.A. 1979. An outbreak of acute Chagas' disease in Sao Francisco Valley region of Bahia, Brazil, triatomine vectors and animal reservoirs of Trypanosoma cruzi. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 73: 703

16) Beltz L.A., Kierszenbaum F. 1987. Suppression of human lymphocyte responses by Trypanosoma cruzi. *Immunol.* 60: 309

17) Berzofsky J.A., Cease K.B., Cornette J.L., Spouge J.L., Margalit H., Berkower I.J., Good M.F., Miller L.H., De Lisi C. 1987. Protein antigenic structures recognized by T cells: Potential applications to vaccine design. *Immunol.Rev.* 98: 9

18) Blotta M.H.S., Curotto M.A., Abrahamson I. 1986. Specific suppression of delayed hipersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice. *Paras. Immunol.* 8: 651

19) Bonet A.H., J.A.Cichero, E.Kushnir, J.C.Grand, E.L.Segura. 1968. Estudio epidemiológico sobre la Enfermedad de Chagas Mazza en comunidades rurales de la provincia de Córdoba. *La Semana Médica* 133: 581

20) Bontempi E., Cazulo B., Ruiz A.M., Cazzulo J.J. 1984. Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of Trypanosoma cruzi. *Comp.J.Physiol.* 77B (3): 599

- 21) Bouillon F., Sinagra A., Lauricella M., Barra J., Besanson M., Lejour Ch., Lopez Blanco O., Favalora R., Segura E.L. 1988. Experimental cardiac transplantation and chronic Chagas' disease in dogs. *Transpl.Proc.* en prensa.
- 22) Boveris A., Sies H., Martino E.E., Docampo R., Turrens J.F., Stoppani A.O.M. 1980. Deficient utilization of H_2O_2 in Trypanosoma cruzi. *Biochem.J.* 188: 643
- 23) Brener Z. 1980. Immunity to Trypanosoma cruzi *Adv.Parasitol.* 18: 247
- 24) Brener Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. *Rev.Inst.Med.Trop. Sao Paulo* 4: 389
- 25) Brener Z., Chiari E. 1971. The effect of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas' disease. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 65: 629
- 26) Britten V., Hudson L. 1985. Isolation and characterization of human T-cell lines from a patient with Chagas' disease. *The Lancet.* 456: 637
- 27) Britten V., Hudson L. 1986. Immune suppression to Trypanosoma cruzi antigens is associated with infection but not immunization. *Trop.Med.Parasitol.* 37: 97
- 28) Burgess D.E., Hanson W.L. 1980. Trypanosoma cruzi: the T- cell dependence of the primary immune response and the effects of the depletion of T-cells and Ig- bearing cells on immunological memory. *Cell.Immunol.* 52: 176
- 29) Burgess D.E., Kuhn R.E., Carlsson K.S. 1981. Induction of parasite specific helper T lymphocytes during Trypanosoma cruzi infection. *J.Immunol.* 127: 2092
- 30) Cardoni R.L., Rimoldi M.T., de Bracco M.M.E. 1984. Antibody-dependent cytotoxicity of human and mouse mononuclear cells against Trypanosoma cruzi epimastigotes. *Cell.Immunol.* 86: 519

- 31) Cardoni R.L., Rimoldi M.T., Esteve M., Segura E.L. de Bracco M.M.E. 1983. Correlación entre la actividad de anticuerpos mediadores de citotoxicidad contra el Trypanosoma cruzi y la resistencia a la infección. Medicina (Buenos Aires) 43: 863
- 32) Cardoni R.L., Rottenberg M.E., Segura E.L. 1988. A radiometric assay for a short term evaluation of the destruction of the infective forms of Trypanosoma cruzi. Parasitol.Res. en prensa
- 33) Castagnino H.E., Cicco J.A., Fauth M., Thompson A.C. 1978. Miocardiopatía embolígena en la Enfermedad de Chagas. Medicina (Buenos Aires) 38: 35
- 34) Castes M., Panagiotopoulos A., Mosca W. 1986. Demonstration of an indomethacin-sensitive mechanism regulating immune reactivity in Chagas' disease patients. Immunopharmacol. 12: 203
- 35) Cerisola J.A., Lugones H., Rabinovich A. 1972. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. 6to Premio Científico "F. Antonio Rizutto" Talleres Gráficos Elias Potter S.R.L., Buenos Aires.
- 36) Cerisola J.A., Rabinovitch A., Alvarez M., di Corletto C.H., Pruneda J. 1972. Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. Bol.Of.Sanit.Panam. 73: 203
- 37) Cillari E., Liew F.W., Lelchuk R. 1986. Suppression of Interleukin 2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with Leishmania major. Infect.Immun. 54: 386
- 38) Clinton B.A., Ortiz-Ortiz L., Garcia W., Martinez T., Capin R. 1975. Trypanosoma cruzi: early immune responses in infected mice. Exp.Parasitol.37: 417
- 39) Corsini A.C., Braz R., Ciampi D.B., Zucato M.R.L. 1982. Resistance to Trypanosoma cruzi infection in relation to the timing of IgG humoral response. 1982. Z.Parasitenk. 68: 15
- 40) Corsini A.C., Sterini A. 1981. Immune T cells control Trypanosoma cruzi infections. Experientia. 37: 904

- 41) Cossio P.M, Damilano G., de la Vega M.T., Laguens R.P., Cabeza Meckert P., Diez C., Arana R. 1976. In vitro interactions between lymphocytes of chagasic individuals and heart tissue. *Medicina (Buenos Aires)* 36: 287
- 42) Culbertson J.T., Kolodny M.H. 1938. Acquired immunity in rats against Trypanosoma cruzi. *J.Parasitol.* 24: 83
- 43) Cunningham D.S., Grogl.M., Kuhn R.E. 1980. Suppression of antibody responses in humans infected with Trypanosoma cruzi. *Infec.Immun.* 30: 496
- 44) Cunningham D.S., Kuhn R.E. 1980. Lymphoblast transformation as a measure of immune competence during experimental Chagas' disease. *J.Parasit.* 66: 390
- 45) Cunningham D.S., Kuhn R.E. 1980. Trypanosoma cruzi-induced suppressor substance. I. Cellular involvement and partial characterization. *J.Immunol.* 124: 2122
- 46) Cunningham D.S., Kuhn R.E. 1980. Trypanosoma cruzi-induced suppressor substance. II. Regulatory activity. *Immunogenetics* 10: 557
- 47) Cunningham D.S., Kuhn R.E., Rowland E.C. 1978. Suppression of humoral responses during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Infec.Immun.* 22: 155
- 48) Chagas'disease: report of a study group. 1960. World Health Organization. Tech Report Ser 202
- 49) Chagas C. 1909. Nova Trypanosomiase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.gen.n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homen. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 1: 159
- 50) Chagas C. 1916. Trypanosomiase americana: forma aguda da molestia. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 8: 37
- 51) Choromansky L., Kuhn R.E. 1985. Interleukin 2 enhances specific and nonspecific immune responses in experimental Chagas' disease. *Infec.Immun.* 50: 354

- 52) Choromanski L., Kuhn R.E. 1986. Repeated antigenic stimulation overcomes immunosuppression in experimental Chagas' disease. *Immunol.* 59: 289
- 53) Dalmasso A.F., Jarvinen J.E. 1980. Experimental Chagas' disease in complement deficient mice and guinea pigs. *Infec.Immun.* 28: 434
- 54) de Martini G.J.W., Abramo Orrego L., de Rissio A.M., Alvarez M., Mujica L.P. 1980. Cultivo de Trypanosoma cruzi en un medio monofásico. Su aplicación en cultivos en gran escala y procesos de fermentación. *Medicina(Buenos Aires)* 40(sup 1): 109
- 55) de Titto E.H., Araujo F.G. 1987. Mechanism of cell invasion by Trypanosoma cruzi: importance of sialidase activity. *Acta Tropica* 44: 273
- 56) de Titto E.H., Braun M., Lázzari J.O., Segura E.L. 1985. Cell mediated reactivity against human and Trypanosoma cruzi antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. *Immunol.Letters.* 9: 249
- 57) de Titto E.H., Catterall J.R., Remington J.S. 1986. Activity of recombinant tumor necrosis factor on Toxoplasma gondii and Trypanosoma cruzi. *J.Immunol.* 137: 1342
- 58) de Titto, E.H., Segura E.L., Braun M. 1983. Cellular immunity in Chagas' disease patients. Lymphoproliferative response to subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. *Immunol.Letters.* 6: 161
- 59) D'Imperio Lima M.R., Eisen H., Minoprio P., Joskowicz M., Coutinho A. 1986. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitaemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J.Immunol.* 137: 353
- 60) D'Imperio Lima M.R., Joskowicz M., Coutinho A., Kipnis T., Eisen H. 1985. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque forming cell responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. *Eur.J.Immunol.* 15: 201
- 61) Djeu J.Y., Timonen T., Heberman R.B. 1982. Production of interferon by human natural killer cells in response to mitogens, viruses and bacteria. NK cells and other natural effector cells R.B. Heberman ed. Academic Press: 669

- 62) Donnelly R.P., La Via M.F., Tsang K.Y. 1987. Humoral-mediated suppression of interleukin-2 dependent target cell proliferation in acquired immune deficiency syndrome (AIDS): interference with normal IL-2 receptor expression. Clin.Exp. Immunol. 68: 488
- 63) dos Santos R.R., Hudson L. 1980. Trypanosoma cruzi: immunological consequences of parasite modification of host cells. Clin.Exp.Immunol. 49: 36
- 64) dos Santos R.R., Hudson L., 1980. Trypanosoma cruzi: binding of parasites antigens to mammalian cell membranes . Parasite Immunol. 2: 1
- 65) Dresser D.W. 1986. Assays for Ig-secreting cells. Handbook of Experimental Immunology. D.M.Weir Ed. Blackwell Sci. Publications. (London, New York)
- 66) Engel J.C., Doyle P., Dvorak J.A. 1985. Biological characterization of clones derived from chronic chagasic patients. II. Quantitative analysis of intracellular cycle. J.Protozool. 32: 80
- 67) Farrar J.W.Z., Kagan I.G., Overton F.O., Sellers T.F. 1963. Serological evidence of human infection with Trypanosoma cruzi in Georgia. Am.J.Hyg. 78: 166
- 68) Farrel J.P., Kirkpatrick C.E. 1987. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. a possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in Leishmania major-infected balb/c mice. J.Immunol. 138: 902
- 69) Fierrer J., Salmon J.A., Askonas B.A. 1984. African trypanosomiasis alters prostaglandin production by murine peritoneal macrophages. Clin.Exp.Immunol. 58: 548
- 70) Fleming B., Rook G.A.W. 1982. T-cell dependent polyclonal activation by soluble mycobacterial extracts of B cells in peripheral blood cell populations from leprosy patients and normal donors. Immunol. 47: 589
- 71) Francis M.J., Fry C.M., Bittle J.L., Houghten R.A., Lerner R.A. Brown F. 1987. Immune response to uncouples peptides of foot and mouth disease virus. Immunol 61: 1

- 72) Gidlund M., Orn A., Wigzell H., Senik A. Gresser I. 1980. Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature*. 273: 759
- 73) Gillis S., Smith K.A. 1977. Long term culture of tumor specific cytotoxic T cells. *Nature* 268: 154
- 74) Gleishmann E., Pals S.T., Rolink A.G., Radaskiewicz T., Gleishmann H. 1984. Graft vs.host reactions: clues to etiopathology of a spectrum of immunological diseases. *Immunol.Today* 5: 324
- 75) Goldberg S.S., Cordeiro M.N., Silva Pereira A.A., Mares-Guia M.L. 1983. Release of lipopolisaccharide (LPS) from cell surface of T.cruzi by EDTA. *Int.J.Parasitol* 13: 11
- 76) Gonzalez Cappa S.M., Cantarella A.I., Lajmanovich S., Segura E.L. 1976. Experimental Chagas' disease: Studies on the stability of a protective antigen. *J.Parasitol* 62: 130-131
- 77) Granzotti J.A., Rocha G.M., Arevalo J.R.G., Ferriolli Filho F. 1985. Cardiopatia chagastica em crianças. Relato de dois casos. *Rev.Inst.Med.Trop. Sao Paulo* 27: 341-345.
- 78) Good M.G., Maloy L., Lunde M.N., Margalit H., Cornette J.L., Smith G.L., Moss B., Miller L.H., Berzofsky J.A. 1987. Construction of synthetic immunogen: use of new T helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* 235: 1059
- 79) Gurtler R., Lauricella M., Solarz N., Bujas M.A., Wisnivesky-Colli C. 1986. Dynamics of transmission of Trypanosoma cruzi in a rural area of Argentina. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*. 28: 28-35
- 80) Gusmao R.A., Rassi A., Rezende J.M., Neva F. 1984. Specific and non specific lymphocyte blastogenic responses in individuals infected with Trypanosoma cruzi. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 35: 827-834
- 81) Habu S., Fukui H., Shimamura K., Kasai M., Nagai Y., Okomura K., Tamakoi N. 1981. In vivo effects of anti-asialo GM-1. *J.Immunol.* 127: 34

82) Hardt C., Rollinghoff M., Pfizenmaier K., Mosmann H., Wagner H. 1981. Lyt23+ cyclophosphamide sensitive T cells regulate the activity of an interleukin-2 inhibitor in vivo. J.Exp.Med. 154: 262

83) Harel-Bellan A., Joskowicz M., Fradelizi D., Eisen H. 1983. Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with Trypanosoma cruzi. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 80: 3466

84) Harel-Bellan A, Joskowicz M., Fradelizi D., Eisen H. 1985. T-lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to interleukin 2. Eur.J.Immunol. 15: 438

85) Hatcher F.M., Kuhn R.E. 1981. Spontaneous lytic activity against allogeneic tumor cells and depression of specific cytotoxic responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. J.Immunol. 126: 2436

86) Hatcher F.M., Kuhn R.E., Cerrone M.C., Burton R.C. 1981. Increased natural killer cell activity in American Trypanosomiasis. J.Immunol. 127: 1126

87) Hatcher F.M., Kuhn R.E. 1982. Destruction of Trypanosoma cruzi by natural killer cells. Science. 218: 295

88) Hayes M.M., Kierszenbaum F. 1980. Evaluation of lymphocyte responsiveness to polyclonal activators during acute and chronic Trypanosoma cruzi infection. Am.J.Trop.Med.Hyg. 29: 708

89) Heberman R.B., Hiserodt J., Vujanovic N., Balch C., Lotzova E., Golub S., Lanier L.L., Phillips J.H., Ricardi C., Ritz J., Santoni A., Schmidt R.E., Uchida A., Lymphokine activated killer cell activity. 1987. Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. Immunol.Today 8 (6): 178

90) Henry C. 1983. **En Selected methods in cellular immunology.** Ed. Mishell B.B. Shiigi S.M. Freeman Co. San Francisco, USA: 211

91) Henry C., Chen Y.U., Stout R., Swain S.L. 1983. **Selected methods in cellular immunology.** Ed. Mishell B.B. & Shiigi S.M. Freeman Co. San Francisco, USA: 182

- 92) Herrington D.A., Clyde D.F., Losonsky G., Cortesia M., Murphy J.R., Davis J., Baqar S., Felix A.M., Heimer E.P., Gillensen D., Nardin E., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V., Hollingdale M.R., Levine M.M. 1987. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against Plasmodium falciparum sporozoites. *Nature* 328: 257-259.
- 93) Hoare C.A. 1972. The trypanosomes of mammals. en: A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications Ed. (Oxford-Edinburgh) : 62
- 94) Hudson L. 1983. Immunopathogenesis of experimental Chagas' disease in mice: damage to the autonomic nervous system. En Cytopathology of parasitic disease. Pitman Books. London (Ciba Foundation symposium 99): 234
- 95) Ibañez, C.F., Affranchino J.L., Frasch A.C.C. 1987. Antigenic determinants of Trypanosoma cruzi defined by cloning of parasite DNA. *Mol.Bioch Parasitol.* 25: 175
- 96) Inoue T., Sendo F. 1983. In vitro induction of cytotoxic polymorphonuclear leukocytes by supernatants from concanavalin A-stimulated spleen cell culture. *J.Immunol.* 131: 2508
- 97) Isakov N., Scholz W., Altman A. 1986. Signal transduction and intracellular events in T-lymphocyte activation. *Immunol. Today* 7(9): 271
- 98) James S.L., Kipnis T., Sher A., Hoff R. 1982. Enhanced resistance to Trypanosoma cruzi in mice treated with an interferon inducer. *Infec.Immun.* 35: 588
- 99) Kagan I., Norman L. 1961. Immunologic studies on Trypanosoma cruzi. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of T.cruzi. *J.Infect.Dis.* 108: 213
- 100) Kagan I.G., Norman L. 1962. Immunological studies on Trypanosoma cruzi. IV. Serial transfer of organisms from immune to nonimmune mice. *J.Parasitol.* 48: 584
- 101) Kasai M., Iwamori M., Nagai Y, Okumura K., Tada T. 1980. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur.J.Immunol.* 10: 175

- 102) Kauffmann S.H. 1988. CD8+ lymphocytes in intracellular microbial infections. Immunol. today 9 (6): 168
- 103) Kiderfen A.F., Kaufmann S.H.E., Lohmann-Matthes M.L. 1987. Protection of mice against the intracellular bacterium Listeria monocytogenes by recombinant murine immune interferon. Eur.J.Immunol. 14: 964
- 104) Kierszenbaum F. 1979. Antibody-dependent killing of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi by human peripheral blood leukocytes. Am.J.Trop.Med.Hyg. 28: 965
- 105) Kierszenbaum F. 1980. Protection of congenitally athymic mice against Trypanosoma cruzi by passive antibody transfer. J.Parasitol. 66: 673
- 106) 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. Immunol. 44: 641
- 107) Kierszenbaum F. 1982. Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (Trypanosoma cruzi infection): Role of adherent, nonspecific esterase-positive splenic cells. J.Immunol. 129: 2202
- 108) Kierszenbaum F., Budzko D.B. 1982. Trypanosoma cruzi: deficient lymphocyte reactivity during acute Chagas' disease in the absence of suppressor T cells. Parasite.Immunol. 4: 441

- 109) Kierszenbaum F., Gottlieb C.A., Budzko D.B. 1983. Exacerbation of Trypanosoma cruzi infection in mice treated with the immunoregulatory agent cyclosporin A. Trop. Med. Parasitol. 34: 4
- 110) Kierszenbaum F., Hayes M.M. 1980. Requirements for cellular destruction of circulating forms of Trypanosoma cruzi in human and murine in vitro systems. Immunol. 40: 61
- 111) Kierszenbaum F., Hayes. M.M. 1980. Evaluation of lymphocyte responsiveness to polyclonal activators during acute and chronic experimental Trypanosoma cruzi infection. 1980. Am.J.Trop.Med Hyg. 29: 708
- 112) Kierszenbaum F., Howard J.G. 1976. Mechanisms of resistance against Trypanosoma cruzi infection: the importance of antibodies and antibody forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J.Immunol. 116: 1208
- 113) Kierszenbaum F., Pienlowski M.M. 1979. Thymus dependent control of host defence mechanisms against Trypanosoma cruzi infection. Infec.Immun. 24: 117
- 114) Kierszenbaum F., Sonnenfeld G. 1982. Characterization of the antiviral activity produced during Trypanosoma cruzi infection and protective effects of exogenous interferon against experimental Chagas' disease. J.Parasit. 68: 194
- 115) Koberle F. 1968. Chagas' disease and Chagas syndromes. The pathology of American Trypanosomiasis. Adv.Parasitol. 6: 63
- 116) Kohl S., Pickering L.K., Frankel L.S., Yaeger R.G. 1982. Reactivation of Chagas' disease during therapy of acute lymphocytic leukaemia. Cancer. 50: 827
- 117) Koo G.C., Peppard J.R. 1984. Establishment of monoclonal anti-NK 1.1 antibody. Hybridoma 3: 301
- 118) Krettli A.U., Brener Z. 1976. Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infection. J.Immunol. 116: 755
- 119) Krettli A.U., Brener Z. 1982. Resistance against Trypanosoma cruzi associated to anti-living trypomastigote antibodies. J.Immunol. 128: 2009

- 120) Krettli A.U. 1982. Antibodies to Trypanosoma cruzi in experimental and human infections. Afr.J.Clin.Exp.Immunol. 3: 327
- 121) Kumar R., Kline I., Abelman W. 1970. Immunosuppression in experimental acute and subacute chagasic myocarditis. Am.J.Trop.Med.Hyg. 19 (6): 932
- 122) Lafaille J.F., Linss J., Cardoso M.A.B., Krieger M.A., Aymerich S., Goldemberg S. 1987. Cloning of Trypanosoma cruzi stage specific genes. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 82: 252
- 123) Lages-Silva E., Ramirez L.E., Krettli A.U., Brener Z. 1987. Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of Trypanosoma cruzi blood forms by macrophages. Parasite Immunol. 9: 21
- 124) Lalonde R.G., Ali-Khan Z., Tanowitz H.B. 1985. Trypanosoma cruzi: Regulation of mitogenic responses in genetically resistant and susceptible inbred strains. Exp.Parasitol. 59: 33
- 125) Laranja F.S., Dias E., Nobrega G., Miranda A. 1956. Chagas' disease , a clinical, epidemiologic and pathologic study. Circulation 14: 1035
- 126) Lelchuk R., Cardoni R.L., Fuks A.S. 1977. Cell mediated immunity in Chagas' disease. Alterations induced by treatment with a trypanocidal drug. Clin.Exp.Immunol. 38: 376
- 127) Lelchuk R., Cardoni R.L., Manni J. 1974. Studies of cellular immunity in Chagas' disease: effect of glutaraldehyde treated specific antigen on inhibition of leukocyte migration. J.Immunol. 112: 1578
- 128) Lelchuk R., Playfair J.H.L. 1985. Serum IL-2 inhibitor in mice. I. Increase during the infection. Immunol. 56: 113
- 129) Lewis G.K, Kamin R. 1983. en **Selected methods in cellular immunology**. Ed. Mishell B.B. & Shiigi S.M. Freeman Co. San Francisco, USA: 227

- 130) Liew F.Y., Scott M.T., Liu D.S., Croft S.L. 1987. Suppressive substance produced by T cells from mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. I. Preferential inhibition of the induction of delayed-type hypersensitivity. J.Immunol.139: 2452
- 131) Liew F.Y., Schmidt J.A., Liu D.S., Millott S.M., Scott M.T., Dhaliwal J.S., Croft S.L. 1988. Suppressive substance produced by T cells from mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. II. Partial biochemical characterization. J.Immunol. 140: 969
- 132) Lima-Martins M.V.C., Sanchez G.A., Krettli A.U., Brener Z. 1985. Antibody dependent cellular cytotoxicity against Trypanosoma cruzi is only mediated by protective antibodies. Parasite Immunol. 7: 367
- 133) Lindqvist C., Mogensen E.L., Koman A. 1988. Method for measurement of high and low affinity interleukin 2 receptors on several cell lines at the same time. J.Immunol.Method, en prensa.
- 134) Lopez A.F., dos Ribeiro R.R., Sanderson C.J. 1983. Antibody-dependent cytotoxicity of Trypanosoma cruzi antigen-coated mouse cell lines by eosinophils and neutrophils. Par.Immunol. 5: 77
- 135) Lowenthal J.W., Greene W.C. 1987. Contrasting interleukin 2 binding properties of the alpha (p55) and beta (p70) protein subunits of the human high-affinity interleukin 2 receptor. J.Exp.Med. 166: 1156
- 136) Lowry D.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Pholin-phenol reagent. J.Biol.Chem. 193: 265
- 137) Maleckar J.R., Kierszenbaum.F. 1983. Variations in cell mediated immunity to Trypanosoma cruzi during experimental Chagas' disease. Ann.Trop.Med.Parasitol. 77: 247
- 138) Malek T.R., Ashwell J.D., Germain R.N., Shevach E.M., Miller J. 1987. The murine interleukin 2 receptor: Biochemical structure and Regulation of Expression. Immunol.Rev. 90: 81

139) Malek T.R., Robb R.J., Shevach E.M. 1983. Identification and initial characterization of a rat monoclonal antibody reactive with the murine interleukin 2 receptor-ligand complex. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 80: 5694

140) Martins M.S., Hudson L., Krettli A.U., Cancado J.R., Brener Z. 1985. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to Trypanosoma cruzi infection. Clin.Exp.Immunol. 61(2): 85

141) McCabe R.E., Luft B.J., Remington J.S. 1984. Effect of murine interferon- γ on murine toxoplasmosis. J.Infect.Dis. 150: 961

142) McCabe R.E., Remington J.S., Araujo F.G. 1985. In vivo and in vitro effects of cyclosporin A on Trypanosoma cruzi. Am.J.Trop.Med.Hyg. 34(5): 861

143) Mc. Hardy N. 1980. Passive protection of mice against Trypanosoma cruzi using convalescent mouse serum. Tropenmed.Parasitol. 28: 195

144) Mc. Hardy N. 1981. Passive protection of mice against Trypanosoma cruzi infection with plasma: the use of blood and vector bug derived trypomastigote challenge. Parasitol. 80: 471

145) Melo R., Brener Z. 1978. Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J.Parasitol. 64: 475

146) Meuer S.C., Hussey R.E., Cantrell D.A., Hodgdon J.C., Schlossman S.F., Smith K.A., Reinherz R.E. 1984. Triggering of the T3Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin 2 dependent pathway. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 81: 1509

147) Minoprio P., Coutinho A., Joskowicz M., D'Imperio Lima M.R., Eisen H. 1986. Polyclonal lymphocyte response to murine Trypanosoma cruzi infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. Scand.J.Immunol. 24: 669

148) Minoprio P.M., Eisen H., Forni L., D'Imperio Lima, Joskowicz M., Coutinho A. 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. I. Quantitation of both T and B cell responses. Scand.J.Immunol. 24: 661

- 149) Minoprio P., Eisen H., Joskowicz M., Pereira P., Coutinho A. 1987. Suppression of polyclonal antibody production in Trypanosoma cruzi infected mice by treatment with anti L3T4 antibodies. J.Immunol. 139: 545
- 150) Mishell B.B., Mishell R.I., Shiigi J.M. 1983. En **Selected methods in cellular immunology**. Ed. Mishell B.B. & Shiigi S.M. Freeman Co. San Francisco, USA: 175
- 151) Mogil R.J., Patton C.L., Green D.G. 1987. Cellular subsets involved in cell-mediated immunity to murine Plasmodium yoelii 17X malaria J.Immunol.138(6) 1933
- 152) Montufar O.M.B., Mussati C.C., Mendes E., Mendes N.F. 1977. Cellular immunity in chronic Chagas' disease. J.Clin.Microbiol. 5: 401
- 153) Mosca W., Plaja J. 1981. Delayed hypersensitivity to heart antigens in Chagas' disease as measured by in vitro lymphocyte stimulation. J.Clin.Microbiol. 14: 1
- 154) Mosca W., Plaja J., Gallardo E., Garcia Barrios H. 1979. Immune response in human Chagas' disease. I. Lymphocyte blastogenesis in chagasic patients without evidence of cardiomyopathy. Acta Cient.Venez. 30: 401
- 155) Moya P., Barousse A.P. 1984. Enfermedad de Chagas congénita. Enfermedad de Chagas. Aportes del Programa Nacional de Investigación en Enfermedades Endémicas. 1979-1983. Ministerio de Educación y Justicia. Secretaría de Ciencia y Técnica: 51
- 156) Mule J.J., Shu S., Schwarz S.L., Rosenberg S.A. 1984. Adoptive immunotherapy of established metastases with LAK cells and recombinant interleukin 2. Science 225: 1487
- 157) Muller L.A., Añasco N., Gonzalez Cappa S.M. 1986. Trypanosoma cruzi: Isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit. Exp.Parasitol. 61: 284
- 158) Murray H.W., Carriero S.M., Donnelly D.M. 1986. Presence of a Macrophage-Mediated Suppressor Cell Mechanism during cell-mediated immune response in experimental visceral Leishmaniasis. Infect.Immun. 54: 487

- 159) Murray H.W., Rubin B.Y., Rothermel C.D. 1983. Killing of intracellular Leishmania donovani by lymphokine stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon gamma is the activating lymphokine. J.Clin.Invest. 72: 1506
- 160) Murray H.W., Spitalny G.L., Nathan C.F. 1985. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. J.Immunol. 134(3): 1619
- 161) Murray H.W., Stern J.J., Welte K., Rubin B.Y., Carriero S.M., Nathan C.F. 1987. Experimental visceral leishmaniasis: Production of interleukin 2 and interferon tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon J.Immunol. 138: 2290
- 162) Nath I., Jayarman J., Sathish M., Bhutani L.K., Sharma A.K. 1984. Inhibition of interleukin-2 production by adherent cell factors from lepromatous patients. Clin.Exp.Immunol. 58: 531
- 163) Nathan C., Murray H.W., Weibe M.E., Rubin B.Y. 1983. Identification of interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J.Exp.Med. 158: 670
- 164) Nathan C.F., Nogueira N., Juanghanich C., Ellis C.J., Cohn Z.A. 1979. Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and the killing of Trypanosoma cruzi. J.Exp.Med. 149: 1056
- 165) Nickel S.P., Gebremichael A., Hoff R., Boyer M.H. 1987. Isolation and functional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite Trypanosoma cruzi. J.Immunol. 138: 914
- 166) Nogueira N. 1983. Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by Trypanosoma cruzi in Cytopathology of parasitic diseases. Pitman Books (London)
- 167) Nogueira N., Cohn Z. 1977. Trypanosoma cruzi: Uptake and intracellular fate in normal and activated macrophages. Am.J.Trop.Med.Hyg. 26: 194

- 168) Nogueira N., Chaplan S., Cohn Z. 1980. Factors modifying ingestion and fate of bloodform trypomastigotes. J.Exp.Med. 152: 447
- 169) Nogueira N., Chaplan S., Reesnik M., Tydings J., Cohn Z.A. 1982. Trypanosoma cruzi: Induction of microbicidal activity in human mononuclear phagocytes. J.Immunol. 128: 2142
- 170) Nogueira N., Ellis C.J., Chaplan S., Cohn Z. 1981. Trypanosoma cruzi: In vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. Exp.Parasitol. 51: 325
- 171) O'Daly J.A., Simonis S., de Rolo N., Caballero H. 1984. Suppression of humoral immunity and lymphocyte responsiveness during experimental Trypanosoma cruzi infections. Rev.Inst.Med.Trop.SaoPaulo 26: 67
- 172) Olabuenaga S., Cardoni R.L., Segura E.L., Riera N.E., de Bracco M.M.E. 1979. Antibody dependent cytotoxicity of Trypanosoma cruzi by human polymorphonuclear leukocytes. Cell.Immunol. 45: 85
- 173) Olabuenaga S.E., Rimoldi M.T., Cardoni R.L., Riera N.E., Sanchez R.A., Chiale P., de Bracco M.M.E. 1983. Actividad citotóxica de leucocitos de pacientes chagasicos crónicos contra Trypanosoma cruzi. Medicina(Buenos Aires) 43: 168
- 174) Ortiz-Ortiz L., Parks D.E., Rodriguez M., Weigle W.O. 1980. Polyclonal B lymphocyte activation during Trypanosoma cruzi infection. J.Immunol. 124: 121
- 175) Osuna A., Ortega G., Gamarro F., Catanys S., Ruiz-Perez L. 1986. Effects of interferon on the infectivity of Trypanosoma cruzi in cultured HeLa cells. Int.J.Parasitol. 15: 167
- 176) Patrucco A., Cerisola J.A., Michel M., Chiale P., Alvarez M., Segura E.L. 1978. Flagellar antigens and the leukocyte migration inhibition test in Chagas' disease patients. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 72: 425
- 177) Persson U. 1977. Lypopolysaccharide induced suppression of primary immune response to a thymus-dependent antigen. J.Immunol. 118: 7

178) Perussia B., Dayton E.T., Fanning V., Thiagarajan P., Hoxie J., Trinchieri G. 1983. Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J.Exp.Med.* 158: 2058

179) Peterson D.S., Wrightsman R.A., Manning J.E. 1986. Cloning of a major surface antigen gene of Trypanosoma cruzi and identification of a nonapeptide repeat. *Nature* 322, 566

180) Plata F. 1985. Enhancement of tumor growth correlates with suppression of the tumor specific cytolytic T-lymphocyte response in mice chronically infected by Trypanosoma cruzi. *J.Immunol.* 134(2): 1312

181) Plata F., Garcia-Pons F., Wietzerbin J. 1987. Immune resistance to Trypanosoma cruzi: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. *Ann.Inst.Pasteur Immunol* 138: 397

182) Plata F., Wietzerbin J., Garcia Pons F., Falcoff E., Eisen H. 1984. Sinergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by Trypanosoma cruzi in vitro. *Eur.J.Immunol.* 14: 930

183) Playfair J.H.L., De Souza J.B. 1987. Recombinant gamma interferon is a potent adjuvant for a malaria vaccine in mice. *Clin.Exp. Immunol.* 667: 5

184) Ramos C., Schadtler-Siwon I., Ortiz-Ortiz L. 1979. Suppressor cells present in the spleens of Trypanosoma cruzi infection in mice. *J. Immunol.* 122: 1243

185) Ramsted U., Wigzell H. 1986. Natural killer cells. en *Handbook of experimental immunology*. Weir D.M. ed. Blackwell Sci. Publications (London, New York)

186) Rappaport R.S., Dodge G.R. 1982. Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2. *J.Exp.Med.* 155: 943

- 187) Reed S.G. 1980. Adoptive transfer of resistance to acute Trypanosoma cruzi infection with T-lymphocytes enriched spleen cells. *Infec.Immun.* 28: 404
- 188) Reed S.G., Inverso J.A., Roters S.B. 1984. Heterologous antibody responses in mice with Trypanosoma cruzi infection: depressed T helper function restored with supernatants containing interleukin 2. *J.Immunol.* 133: 1558
- 189) Reed S.G., Inverso J.A., Roters S.B. 1984. Suppressed antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic Trypanosoma cruzi infections are restored with interleukin 2. *J.Immunol.* 133: 3335
- 190) Reed S.G. Nathan C., Pihl D.L., Rodricks P., Shanebeck K., Conlon P.J., Grabstein K.H. 1987. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit Trypanosoma cruzi and release hydrogen peroxide. *J.Exp.Med.* 166: 1734.
- 191) Reed S.G., Roters S., Goidl E.A. 1983. Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non parasite antigen during chronic Trypanosoma cruzi infection in mice. *J.Immunol.* 131: 1978
- 192) Reyes L., Chinchilla M. 1987. Growth inhibition of Trypanosoma cruzi in cultured murine myocardial cells mediated by a specifically induced lymphokine. *Infect.Immun.* 55(6): 1513
- 193) Rezende J.M. 1979. Clinica: Manifestacoes digestivas. En: Trypanosoma cruzi e Doenca de Chagas. Z.Brener y Z.Andrade. Editorial Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro
- 194) Rezende J.M. 1984. The digestive tract in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79 (Supl): 97
- 195) Robb,R.J., Munck A., Smith K.A. 1981. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity and biological relevance. *J.Exp.Med.* 154: 1455
- 196) Roberson E. L., Hanson W.L., Chapman W.L.Jr. 1973. Trypanosoma cruzi: effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp.Parasitol.* 34: 168

- 197) Rocha B., Bandeira A. 1988. Limiting analysis of interleukin 2-producing mature T cells. Interleukin 2 secretion is an exclusive property of L3T4+ lymphocytes. Scand J. Immunol. 27: 47
- 198) Rodriguez A.M., Santoro F., Afchain D., Bazin H., Capron A. 1981. Trypanosoma cruzi infection in B cell deficient rats. Infec.Immun. 31: 524
- 199) Rosebaum M.B. 1964. Chagasic myocardopathy. Prog.Cardiovasc.Dis. 7: 199
- 200) Rosebaum M.B., Cerisola J.A. 1957. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en la República Argentina. O Hospital 60: 75
- 201) Rosen A., Gergely P., Jondal M., Llein G., Britton S. 1977. Polyclonal IgG production after Epstein Barr virus infection of human lymphocytes in vitro. Nature. 267: 52
- 202) Rothermel C.D., Rubin B.Y., Murray H.W. 1983. Gamma-interferon is the factor in lymphokine that activates human macrophages to inhibit intracellular Chlamidia psitacci replication. J.Immunol.131: 2542
- 203) Rowland E.C., Kuhn R.E. 1978. Suppression of anamnestic cellular responses during Trypanosoma cruzi experimental infections. J.Parasitol. 64: 741
- 204) Rowland E.C., Kuhn R.E. 1978. Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infections. Infec. Immun. 29: 393
- 205) Rowland E.C., Ritter D.M. 1984. Corpus Christi strain induced protection to Trypanosoma cruzi infection in C3H(He) mice: transfer of resistance to Brazil challenge with lymphocytes. J.Parasit. 70: 760
- 206) Ruiz A., Esteva M., Meckert P.C., Laguens R.P., Segura E.L. 1985. Protective immunity induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. Acta Tropica 42: 299

- 207) Ruiz A.M., Esteva M., Riarte A., Sub as E., Segura E.L. 1986. Immunoprotection of mice against Trypanosoma cruzi antigens with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. Immunol.Letters. 12: 1
- 208) Sadick M.D., Heinzl F.P., Shigekane V.M., Fisher W.L., Locksley R.M. 1987. Cellular and humoral immunity to Leishmania major in genetically susceptible after in vivo depletion of L3T4+ cells. J.Immunol. 139 (4): 1303
- 209) Sanderson C.J. 1983. Antibody-dependent cytotoxicity of Trypanosoma cruzi antigen-coated mouse cell lines by eosinophils and neutrophils. Parasite Immunol. 5: 77
- 210) Sathish M., Bhutani L.K., Sharma A.K., Nath I. 1983. Monocyte derived soluble suppressor factor(s) in patients with lepromatous leprosy. Infect.Immun. 42(3): 890
- 211) Scott M.T. 1981. The nature of immunity against Trypanosoma cruzi infection in mice recovered from acute infection. Parasite Immunol. 3: 209
- 212) Scott,M.T. 1981. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice: Specific suppressor cells in chronic infection. Immunology 44: 409
- 213) Scott M.T., Bahr G, Moddaber F., Afchain D., Chedid L. 1984. Adjuvant requirements for protective immunization of mice using a Trypanosoma cruzi 90 K cell surface glycoprotein. Int.Archs.AllergyAppl.Immunol. 74: 373
- 214) Scott P.A., Farrel J.P. 1981. Experimental cutaneous leishmaniasis 1. Nonspecific immunosuppression in BALB/c mice infected with Leishmania tropica. J.Immunol. 127: 2395
- 215) Scott M.T., Goss-Sampson M. 1984. Restricted IgG isotype profiles in Trypanosoma cruzi infected mice and Chagas' disease patients. Clin.Exp.Immunol. 58: 372
- 216) Scott M.T., Neal R.A. 1984. The vaccine potential of cell surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi.Phil.Trans.R.Soc. Lond 307: 63

217) Scott M.T., Snary D. 1982. American trypanosomiasis (Chagas' disease) in *Immunology of Parasitic infections* (S.Cohen and K.S.Warren eds) : 261

218) Schmuñis G.A., Gonzalez Cappa S.M., Traversa O.C., Yanovsky J.F. 1971. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy in infections with Trypanosoma cruzi in mice. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 65: 89

219) Scmuñis G.A., Szarfman A. 1978. La Enfermedad de Chagas congénita. *Medicina*(Buenos Aires) 38: 611

220) Schmuñis G.A., Szarfman A., Coarasa L., Guilleron C., Peralta J.M. 1980. Anti-Trypanosoma cruzi agglutinins in acute human Chagas' disease. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 29: 170

221) Schofield L., Villaquiran J., Ferreira A., Schellekens H., Nussenzweig R., Nussenzweig V. 1987. Interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 330: 665

222) Seaman, W.E., Sleisenger M., Eriksson E., Koo G. 1987. Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK1.1. Reduction in host defence against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J.Immunol.* 138: 4539.

223) Seaman W.E., Wofsy D. 1987. in vivo effects of monoclonal antibody to L3T4 en *Immune regulation by characterized polipeptides*. G.Goldstein, J.F.Bach, H.Wigzell eds. Alan R.Liss Inc. (New York)

224) Seaman W.E., Wofsy D., Greenspan J.S., Ledbetter J.A. 1983. Treatment of autoimmune MRL/lpr mice with monoclonal antibody to Thy 1.2: a single injection hs sustained effects on lymphoproliferation and renal disease. *J.Immunol.* 130 (4): 1713

225) Segura E.L., Bua J., Rosestein A., Subias E., Esteva M., Moreno M., Ruiz A.M. 1986. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of Trypanosoma cruzi. *Immunol. letters* 13: 165

226) Segura E.L., Campos J.M., Bronzina A., Cerisola J.A. 1975. Antígenos de las fracciones subcelulares de Trypanosoma cruzi. I. Localización de antígenos y proteínas en las fracciones subcelulares. *Medicina*(Buenos Aires) 35: 451

- 227) Segura E.L., Cura E.N., Paulone I., Vazquez C., Cerisola J.A. 1974. Antigenic make up of subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. J.Protozool. 21: 571
- 228) Segura E.L., Esteva M., Quintans C., Montoro L.S., Weissenbacher M.C. 1981. Infección con Trypanosoma cruzi en ratones congénitamente atímicos. Medicina(Buenos Aires) 41: 328
- 229) Segura E.L., Paulone I., Cerisola J., Gonzalez Cappa S.M. 1976. Experimental Chagas' disease: Protective activity in relation with subcellular fractions of the parasite. Parasitol. 62: 131
- 230) Segura E.L., Perez A.C., Andrade J., Yanovsky J., de Martini G.J.W. 1983. Decrease in the prevalence of infection by Trypanosoma cruzi (Chagas' disease) in young men from Argentina. J.Protozool. 30: 164
- 231) Serrano L.E., O'Daly J.A. 1987. Protein fraction from Trypanosoma cruzi infected spleen cell supernatants with immunosuppressive activity in vitro. Int.J.Parasitol. 17: 851
- 232) Sharma S.D., Hofflin J.M., Remington J.S. 1985. In vivo recombinant IL-2 administration enhances survival against external challenge with Toxoplasma gondii. J. Immunol. 135: 4160
- 233) Sileghem M., Hamers R. Baetselier P. 1987. Experimental Trypanosoma brucei infections selectively suppress both IL-2 production and interleukin 2 receptor expression. Eur.J.Immunol. 17: 1417
- 234) Smith K.A. 1984. Interleukin 2. Annu.Rev.Immunol. 2: 319
- 235) Smith K.A. 1987. The two chain structure of high affinity IL-2 receptors. Immunol.Today 8: 11
- 236) Snary D., Flint J.E. Wood J.N., Dcott M.T., Chapmann M.D., Dodd J., Jessel T.M. Miles M.A. 1983. A monoclonal antibody with specificity for Trypanosoma cruzi, central and peripheral neurones and glia. Clin.Exp.Immunol. 54: 617
- 237) Sokal R.R., Rohlf F.J. 1980. Introducción a la bioestadística. Ed Reverté, Barcelona, España: 103

238) Sokal R.R., Rohlf F.J. 1980. **Introducción a la bioestadística** . Ed Reverté, Barcelona, España: 212

239) Sokal R.R., Rohlf F.J. 1980. **Introducción a la bioestadística** . Ed Reverté Barcelona , España: 284

240) Sonnenfeld G., Kierszenbaum F. 1981. Increased serum levels of an interferon-like activity during the acute period of experimental infection with different strains of Trypanosoma cruzi. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 30: 1189

241) Stewart G.L., Holmes V., Gianini S. 1982. Sarcocystis, Trypanosoma, Toxoplasma, Brugia, Ancylostoma and Trichinella spp: a review of intracellular parasites of striated muscle. *Exp.Parasitol.* 53: 406

242) Suttles J. Schwarting G.A., Stout R.D. 1986. Flow cytometric analysis reveals the presence of asialoGM1 on the surface membrane of alloimmune cytotoxic T-lymphocytes. *J.Immunol.* 136: 1586.

243) Suzuki Y., Orellana M., Scheiber R.D., Remington J.S. 1988. Interferon γ : The major mediator of resistance against Toxoplasma gondii. *Science* 240: 516

244) Szarfman A., Cossio P., Diez C., Arana R.M., Sadun E. 1974. Antibodies against endocardium vascular structures and interstitium of striated muscle that cross react with T.cruzi and T.rhodesiense. *J.Parasitol* 60 (6): 1024

245) Szarfman A., Schmu is G., Vattuone N.H., Yanovsky J.F., Cossio P.M., Arana R.M. 1977. Protection against challenge of mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. *Trop.Med. Parasitol.* 28: 333

246) Szarfman A., Terranova V.P., Rennard S.I., Foidart J.M., Lima M.E., Scheinman J.I., Martin G.R. 1982. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J.Exp.Med.* 155 (4): 1161

- 247) Takehara H.A., Perini A., da Silva M.H., Motta I. 1981. Role of different antibody classes in protection against Trypanosoma cruzi infection in the mouse. *Exp. Parasitol.* 52: 137.
- 248) Taliaferro W.H., Pizzi T. 1955. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. *J.Infect.Dis.* 96: 199
- 249) Tanaguchi T., Matsui H., Fujita T., Takaoka C., Kashima N., Yoshimoto R., Hamuro J. 1983. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302: 305.
- 250) Tanowitz H., Minato N., Lalonde R., Wittner M. 1981. Trypanosoma cruzi: Correlation of resistance and susceptibility in infected mice with the in vitro primary antibody response to sheep red blood cells. *Exp.Parasitol.* 52: 233
- 251) Tanowitz, A.B., Brosman C., Guastamachio D., Baron G., Raventos Suarez C., Bornstein M., Wittner M. 1982. Infection of organotypic cultures of spinal cord and dorsal root ganglia with Trypanosoma cruzi. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 31: 1090
- 252) Tarleton R., Kuhn R.E. 1984. Loss of suppressor activity in the serum of mice infected with Trypanosoma cruzi. *J.Parasitol* 70 (2): 253
- 253) Tarleton R.L., Kuhn R.E. 1984. Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from mice infected with Trypanosoma cruzi by supernatants containing interleukin 2. *J.Immunol.* 133: 1570
- 254) Tarleton R.L., Kuhn R.E. 1985. Measurement of parasite-specific helper T-lymphocytes during Trypanosoma cruzi infections in mice. *Eur.J.Immunol.* 15: 845
- 255) Teixeira A.R.L., Teixeira G., Macedo V., Prata A. 1978. Acquired cell mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *J.Clin.Invest.* 62: 1132
- 256) Teshigawara K., Wang H., Kato K., Smith K. 1987. Interleukin 2 high affinity receptor expression depends on two distinct binding proteins. *J.Exp.Med.* 165: 223
- 257) Tibayrenc M. 1985. On the microdistribution and sexuality of Trypanosoma cruzi. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 79: 882

258) Tibayrenc M., Cariou M.L., Solignac M., Dedet J.P., Poch O., Desjeux P. 1985. New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in Trypanosoma cruzi the causative agent of Chagas' disease. *Genetica*. 67: 223

259) Tibayrenc M., Ward P., Moya A., Ayala F.J. 1986. Natural populations of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83: 115

260) Titus R.G., Milon G., Marshall G., Vassalli P., Cerottini J.C. Louis J.A. 1987. Involvement of specific Lyt 2 + T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur.J.Immunol.* 17: 1429

261) Togna R., Giudice G., Verdini A., Bonelli F., Pessi A., Engers H., Corradin G. 1986. Synthetic Plasmodium falciparum circumsporozoites peptides elicit heterogeneous L3T4+ cell proliferative responses in H-2^b mice. *J.Immunol.* 137: 2956

262) Trinchieri G., Perussia B. 1985. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol.today* 6(4): 131

263) Trischmann T.M. 1983. Non antibody mediated control of parasitaemia in acute experimental Chagas' disease. *J.Immunol.* 130: 1953

264) Trischmann T.M. 1984. Role of cellular immunity in protection against Trypanosoma cruzi in mice. *Parasite Immunol.* 6: 561

265) Trischmann T.M. 1984. Single locus in BXH-2 mice responsible for inability to control early proliferation of Trypanosoma cruzi. *Infec.Immun.* 46: 658

266) Trischmann T.M. 1986. Trypanosoma cruzi: Early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. *Exp.Parasitol.* 62: 194

267) Trischmann T.M., Bloom B.R. 1980. Trypanosoma cruzi. Ability of T cell enriched and depleted lymphocyte populations to passively protect mice. *Exp.Parasitol.* 49: 225

- 268) Tschudi E.I., Anziano D.F., Dalmasso A.P. 1972. Lymphocyte transformation in Chagas' disease. *Infec.Immun.* 6: 905
- 269) Turco J., Winkler H.H. 1983. Cloned mouse interferon gamma inhibits the growth of Rickettsia prowazekii in cultured mouse fibroblasts. *J.Exp.Med.* 158: 2159
- 270) Umekita L.F., Takehara H.A., Mota I. 1988. Role of the antibody Fc in the immune clearance of Trypanosoma cruzi. *Immunol.letters* 17: 85
- 271) Vattuone I.J.H., Szarfman A., Gonzalez Cappa S.M. 1973. Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic Chagas' infections (Chagas' disease) *J.Trop.Med Hyg.* 76: 45
- 272) Villalta F., Kierszenbaum F. 1986. Effects of colony-stimulating factor on the uptake and destruction of a pathogenic parasite (Trypanosoma cruzi) by human neutrophils. *J.Immunol.* 137: 1703
- 273) Villalta F., Kierszenbaum F. 1986. Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanisms of destruction of intracellular (amastigotes) forms of Trypanosoma cruzi by human neutrophils. *J.Immunol.* 131: 1504
- 274) Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Dynatech laboratories. Alexandria. VA, EEUU
- 275) Wang H., Smith K. 1987. The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *J.Exp.Med.* 166: 1055
- 276) Wilde D.B., Marrack P., Kappler J., Dialynas D., Fitch F.W. 1983. Evidence implicating L3T4 in class II MHC antigen reactivity: monoclonal antibody GK.1.5.(anti L3T4 a) blocks class II MHC antigen specific proliferation, release of lymphokines and binding by cloned murine helper T lymphocyte lines *J.Immunol.*131: 2178
- 277) Wiltrout R.H., Santoni A., Peterson E.S., Knott D.C., Overton W.R., Heberman R.B., Holden H.T. 1985. Reactivity of anti-asialo GM-1 serum with tumoricidal and non tumoricidal mouse macrophages. *J.Leuc.Biol.* 37: 597

- 278) Wirth J.J., Kierszenbaum F. 1987. Inhibition of mammalian host cell infection by insect derived, metacyclic forms of Trypanosoma cruzi in the presence of human or rabbit anti T.cruzi antibodies. *Int.J.Parasitol.* 17(3): 841
- 279) Wirth J., Kierszenbaum F., Sonnenfeld G., Zlotnik A. 1985. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association and killing of Trypanosoma cruzi. *Infec.Immun.* 49: 61
- 280) Wofsy D., Mayes D.C., Woodcock J., Seaman W.E. 1985. Inhibition of humoral immunity *in vivo* by monoclonal antibody to L3T4: studies with soluble antigen in intact mice. *J.Immunol.* 135: 1698
- 281) Wofsy, D., Seaman W.E. 1986. Analysis of the function of L3T4+ cells by *in vivo* treatment with monoclonal antibody to L3T4. *Immunol.Res.* 5: 97
- 282) Wong G.H.W., Clark Lewis I., McKimm-Breschkin J.L., Harris A.W., Schrader J.W. 1983. Interferon- γ induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B-lymphoid, macrophage and myeloid cell lines. *J.Immunol.* 131: 788
- 283) Wood J.N., Hudson L., Jessel T.M. Yamamoto M. 1982. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and Trypanosoma cruzi parasites *Nature* 296: 34
- 284) Wrightsman R.A., Krassner S.M., Watson J.D., Manning J.E. 1984. Role of the H-2s haplotype in the survival of mice after infection with Trypanosoma cruzi. *Infec.Immun.* 44: 351
- 285) Yamamoto K., Onodera K., Kakinuma M., Kimura T., Richards F.F. 1985. Involvement of suppressor cells induced with membrane fractions of trypanosomes in immunosuppression of trypanosomiasis. *Parasite Immunol.* 7: 95
- 286) Zavala F., Tam J.P., Hollingdale M.R., Cochrane A.H., Quakyi I., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V. 1985. Rationale for development of a synthetic vaccine against Plasmodium falciparum malaria. *Science* 228: 1436

- 287) Joskowicz M., Said G., Milon G., Marchal G., Eisen H. 1987. L3T4+ cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur.J.Immunol.* 17: 1027
- 288) Okabe K., Kipnis T., Galich V.L.G., Dias da Silava W. 1980. Cell mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. I. Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 16: 344
- 289) Kaufmann S.H.E., Hug E., Vath U., De Libero. 1987. Specific lysis of Listeria monocytogenes infected macrophages by class II-restricted L3T4+ T cells. *Eur.J.Immunol.* 17: 237
- 290) Klinman D.M., Steinberg A.D. 1987. Systemic autoimmune disease arises from polyclonal B cell activation. *J.Exp.Med.* 165: 1755.
- 291) Patarroyo M.E., Romero P., Torres M.L., Clavijo P., Moreno A., Martinez A., Rodriguez R., Guzman F., Cabezas E. 1987. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 328: 629
- 292) Altman A., Theofilopoulos A.N., Weiner R., Katz D.H., Dixon F.M. 1981. Analysis of T cell function in autoimmune murine strains. Defects in production of and responsiveness to interleukin 2. *J.Exp.Med.* 154: 791

ABREVIATURAS:

Acs: Anticuerpos
ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADN: Acido desoxirribonucleico
Ag: Antigeno
ARN: Acido ribonucleico
BSA: Albúmina sérica bovina
BSS: Solución salina balanceada
Con A: Concanavalina A
CPM: cuentas por minuto
DPM: desintegraciones por minuto
DS: Desviación estandar de la media
ELISA: Ensayo inmunoenzimático
ESM: Error estandar de la media
F: Fracción flagelar de epimastigotes de T.cruzi.
FACS: Separador de células activado por fluorescencia
GRC: Eritrocitos de carnero
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
HT: Homogenato total de epimastigotes de T.cruzi
IE: Indice de estimulación
IFN: Interferón
IL-1: Interleuquina 1
IL-2: Interleuquina 2
IL-2R: Receptor de interleuquina 2
Mc: Fracción microsomal de epimastigotes de T.cruzi
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidades
PBS: Buffer fosfato salino pH:7.2
PFC: Células formadoras de placas
RPMI: Medio completo para cultivo de células
SF: Solución fisiológica
SFB: Suero fetal bovino
Tdr: Timidina tritiada

AGRADECIMIENTOS

A Rita Cardoni compañera y guía de ruta científica, a través de baches y bocacalles, porque me enseñó este apasionante oficio, apoyó y escuchó (a veces) ideas y locuras.

A Ernesto de Titto por innumerables correcciones de un sin número de manuscritos, y por tantas otras discusiones de proyectos científicos además de otros.

A Anders Orn y Christer Lindqvist del Instituto Karolinska de Estocolmo, donde se realizaron parte de las experiencias de la tesis, porque me ayudaron y enseñaron sin ningún tipo de reticencias.

A mis compañeros del INDIECh por la colaboración y el clima de trabajo.

A Miriam Postan por la corrección de parte del manuscrito

Al Dr Carlos del Prado por la confección del material fotográfico.

A los integrantes del Departamento de Inmunología del Instituto Karolinska.

Al CONICET, a la SECyT, a SAREC, a la Secretaría de Salud del Ministerio de Salud y Acción Social y al programa de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la OMS por la financiación de este trabajo.

A la Toshiba 1100

A mis padres

A la Dra Elsa Segura porque sin su apoyo este trabajo nunca se hubiera realizado.