

Tesis de Posgrado

Estudios sobre respuestas inmunológicas inducidas por antígenos de la fracción flagelar de Trypanosoma cruzi

Hansen, Diana Silvia

1995

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:

Hansen, Diana Silvia. (1995). Estudios sobre respuestas inmunológicas inducidas por antígenos de la fracción flagelar de Trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2790_Hansen.pdf

Cita tipo Chicago:

Hansen, Diana Silvia. "Estudios sobre respuestas inmunológicas inducidas por antígenos de la fracción flagelar de Trypanosoma cruzi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2790_Hansen.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

ESTUDIOS SOBRE RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS
INDUCIDAS POR ANTÍGENOS DE LA FRACCIÓN FLAGELAR
DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Diana Silvia Hansen

DIRECTOR: *Dra. Mirta Alicia Carlomagno*
CO-DIRECTOR: *Dra. María Villacrés-Eriksson*

INSTITUTO NACIONAL DE CHAGAS, BUENOS AIRES,
ARGENTINA
INSTITUTO DE VETERINARIA DEL ESTADO, UPPSALA,
SUECIA

Tesis para optar al Título de Doctora en Ciencias Biológicas

-1995-

Nº 2790 1
42

***A la memoria de L. Ernersto Hansen, mi padre
y a M. Lucrecia Espinosa de Hansen, mi madre***

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo un proyecto de colaboración entre Argentina y Suecia, financiado por la Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC). Por ese motivo quisiera expresar mi más profunda y sincera gratitud a personas de estos dos países.

A mi directora de Tesis en Argentina, Dra. Mirta Carlomagno, por su incondicional apoyo durante todos estos años, guiando este trabajo pero dándome a la vez la libertad necesaria para "acertar y equivocarme".

A mi supervisor en Suecia, Prof. Bror Morein, por haberme recibido tan cálidamente en su laboratorio y por su inagotable entusiasmo y su confianza en mi y en este proyecto.

A mi co-directora Dra. María Villacrés-Eriksson, por haberme introducido en el apasionante mundo de la Inmunología, contagiándome con su indeclinable capacidad de trabajo aún durante tiempos difíciles, y por su entusiasmo y amistad que crearon en el laboratorio una atmósfera sumamente placentera.

A la Dra. Elsa Leonor Segura, directora del INDIJECH, por haberme dado la posibilidad de realizar este proyecto en la Institución que ella preside, alentando en todo momento el desarrollo de mi trabajo.

A Mónica Esteva, por haberme enseñado a trabajar con los verdaderos protagonistas de esta novela: "Trypanosoma cruzi" y "Triatoma infnstans"

A Lennart Åkerblom, por su gran ayuda con la preparación y caracterización de los anticuerpos monoclonales.

Al Dr. Ulf Hellman del Ludwig Institute for Cancer Research en Uppsala, por su valiosa asistencia con la secuenciación de péptidos y por su calidez y amistad.

A Maija Leena Eloranta, por su asesoramiento en la puesta a punto del ELISA para la detección de TGF- β .

A Barbro Stemso, secretaria del Dpto. de Virología en Suecia, por su inmejorable asistencia administrativa.

A Leticia Orellana, por el cuidado de los animales en Argentina y al personal del Bioterio del BMC en Uppsala.

A Pierre del departamento de Fotografía del BMC, por su asistencia y cumplimiento en mis pedidos "para ayer".

A Gustavo Alievi, por su compañerismo y amistad en el laboratorio en Argentina, y por haber mantenido actualizados mis trámites en la "Jacu", mientras yo estaba en Suecia.

A Susi Laucella y María Ines Antunez, con las quien tuve el honor de compartir estos años de doctorado, por su apoyo y amistad.

A Jackie Bua por su apoyo moral, sus consejos científicos y de los otros....

A Laura Fichera, Daniel Salomon, Daniel Velazco, Ariel Silber, Lilian Johansen, Carlos Pravia, María del Carmen Aranda, Gaby García, Elsa Velazquez, Nora Malagrino, , Elvira Risech, Adelina Riarte, Ada Campanini y Marta Lauricella por su colaboración y buena onda.

A Sigrid Sjölander, por su amistad y por haber compartido conmigo este "increíble" último año de doctorado.

A Karin Lövgren, Jill Ekström, Anders Sjölander, Shahriar Behboudi, Ulrika Allard, Helena Berglund, Bengt Rönnerberg, Claudia Baule, Torsten Fridberger, Ann Nordengrahn, Anna Bellman, Marian Nordenman, Jzzeldin Abuzugra, Malik Merza, Andras Balagui-Pordani, Susana Palacios, Lena Åslund y Klaus Hansen por su colaboración y calidez.

Muy especialmente a Claudita Rabino, Lucía Cavalier y Jorge Blackhall por su entrañable e incondicional amistad, gracias a la cual es tanto mas fácil y divertido vivir lejos de casa....

A la banda latina en Suecia: Horacio Gonda, Claudia Lüttershawtz (y Catu), Alexis Fuentes, Sabina Vidal, Emilia Botello, Ignaci y Mariona Velazquez, Carlos Ros y Marcela Baudo un agradecimiento para ellos con quienes compartimos la experiencia de hacer el doctorado en el Polo Norte.

A mis amigas de siempre, Jimena Tato, Adri Cucchi y Nora Engel por estar siempre ahí.

Y por último y muy especialmente a Jorge, por su incomparable apoyo durante todos estos años tanto en el ámbito personal como en el laboral, pero sobretodo por estar siempre dispuesto a escucharme conteniéndome con su amistad, compañerismo y amor.

ABREVIATURAS

Ag	antígeno
AFP	alfa-fetoproteína
AMBIC	bicarbonato de amonio
Con A	Concanavalina A
cpm	Cuentas por minuto
CSF	Factor de estimulación de colonias
D.E.	Desviación estándar
DTH	Hipersensibilidad de tipo tardío
E.E.	Error estándar
ELISA	Ensayo del inmunoabsorbente unido a enzima
FF	Fracción flagelar
FT	del inglés "flow through"
G-CSF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos
Gp	glicoproteína
HIV	Virus de inmunodeficiencia humano
HT	Homogenato total
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IFN-γ	Interferón- γ
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleuquina-
ISCOMS	Complejo inmunoestimulante
i.v.	intravenoso
kDa	kilo Dalton
kV	kilo Voltio
LPS	Lipopolisacárido

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	minuto
NK	Células agresoras naturales
NP-40	Nonidet P-40
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina estabilizadora de fosfatos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
RIA	Radioinmunoensayo
rpm	revoluciones por minuto
s.c.	subcutáneo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Solución salina estabilizadora de tris
TCA	Acido tricloroacético
TFA	Acido trifluoracético
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β
T_H	Célula T colaboradora
TNF	Factor de necrosis tumoral
V	Voltios

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 El problema	1
1.2 El parásito	2
1.3 La enfermedad	4
1.4 El <i>Trypanosoma cruzi</i> versus la respuesta inmune del huésped	5
1.4.1 Activación policlonal e inmunosupresión	6
1.4.2 Mecanismos inmunológicos involucrados en la resistencia al <i>T. cruzi</i>	11
1.4.3. Patogénesis y autoinmunidad	17
1.5 Antígenos del <i>T. cruzi</i> con propiedades protectoras	19
1.6 Vacunas contra infecciones persistentes	23
1.7 Adyuvantes como inmunomoduladores	23
1.8 Sistemas adyuvantes	24
1.9 Presentación del antígeno en forma multimérica	25
1.10 Complejos inmunoestimulantes (ISCOMS)	26
1.10.1 El componente adyuvante	27
1.10.2 Formación del ISCOM	28
1.10.3 Naturaleza de los antígenos incluidos en ISCOMS	29
1.11 Respuesta inmune inducida por ISCOMS	30
1.11.1 La interacción de los ISCOMS con las células presentadoras de antígeno	30
1.11.2 Activación de esplenocitos inducida por ISCOMS	31
1.11.3 Respuesta de anticuerpos	32
1.11.4 Respuesta de linfocitos T citotóxicos	33

1.11.5 Cinética y distribución de la respuesta inmune inducida por ISCOMS	33
1. 12 Inmunidad protectora inducida por ISCOMS.....	34
1.13 La matrix de ISCOMS como sistema adyuvante	34
1.14 Objetivos	37
2. MATERIALES Y METODOS	38
2.1 Cultivo del parásito	38
2.2 Preparación de homogenato total del parásito y de la fracción flagelar.....	38
2.3 Preparación de ISCOMS de la fracción flagelar (FF-ISCOMS).....	39
2.4 Microscopía Electrónica	39
2.5 Geles de poliacrilamida con SDS	40
2.5.1 Geles de la FF y los FF-ISCOMS	40
2.5.2 Geles de las subfracciones de la FF	40
2.6 Western blotting	40
2.6.1 Western blotting de la FF y los FF-ISCOMS	41
2.6.2 Western blotting con sueros anti-FF/matrix y anti-FT/matrix	41
2.7 Preparación de antisueros	41
2.7.1 Antisueros anti-FF y anti-FF-ISCOMS	42
2.7.2 Antisueros anti-FF/matrix y anti-FT/matrix.....	42
2.8 Enzimoinmunoensayo (ELISA)	42
2.8.1 ELISA con sueros anti-FF y anti-FF-ISCOMS	43
2.8.2 ELISA para el análisis de los sobrenadantes de hibridoma.....	43

2.8.3 ELISA para la evaluación de títulos de anticuerpos anti-FF/matrix y anti-FT/matrix.....	43
2.8.4 ELISA para la detección de isotipos	44
2.9 Ensayos de linfoproliferacion.....	44
2.9.1 Ensayo de linfoproliferacion en esplenocitos de ratones inmunizados con FF y FF-ISCOMS	45
2.9.2 Ensayos de linfoproliferación con las subfracciones de la FF.....	45
2.9.3 Neutralización de la actividad supresiva del Ag 123 con un anticuerpo anti-TGF- β	45
2.9.4 Ensayo de linfoproliferacion en esplenocitos de ratones inmunizados con FF/matrix y FT/matrix	46
2.10 Obtención y estimulación de macrófagos peritoneales murinos	46
2.11 ELISA de captura para la detección de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-10 , IFN- γ , IL-1 e IL-6	46
2.12 ELISA de captura para la detección de TGF- β	47
2.13 Ensayos de hipersensibilidad tardía	49
2.15 Producción de anticuerpos monoclonales	49
2.16 Purificación del anticuerpo monoclonal TC2C123	49
2.17 Acople del anticuerpo TC2C123 a Sepharosa activada con CnBr y purificación de antígenos por afinidad	50
2.18 Marcación metabólica con [^{35}S]-Metionina	50
2.19 Iodinación del homogenato total de parásito	51
2.20 Inmunoprecipitación de lisados de párasito marcados radiactivamente	51
2. 21 Biotinilación de la FF y del FT	52

2.22 Inmunoprecipitación de la FF y del FT biotinilados	52
2.23 Digestión de proteínas y purificación de péptidos	53
2.24 Purificación de péptidos	54
2.25 Secuenciación automática de aminoácidos	54
2.26 Inmunoprecipitación del homogenato total con anti-AFP humano	54
2.27 Obtención de tripomastigotes metacíclicos	55
2.28 Experimentos de inmunoprotección en ratones inmunizados con FF y FF-ISCOMS	56
22.29 Análisis estadístico	56
3. RESULTADOS	57
3.1 Primera parte	
Preparación y caracterización de ISCOMS con la fracción flagelar de <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
3.1.1 Preparación y caracterización de ISCOMS de la fracción flagelar (FF-ISCOMS) de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	58
3.1.2 Respuesta de anticuerpos inducida por FF- ISCOMS	58
3.1.3 Respuesta inmune mediada por células inducida por los FF-ISCOMS	59
3.1.4 Niveles de parasitemia de animales inmunizados con FF-ISCOMS ante un desafío parasitario	60
3.2 Segunda Parte	
Caracterización de un antígeno de la fracción flagelar de <i>Trypanosoma cruzi</i> que suprime la	

proliferación celular por un mecanismo dependiente de TGF- β	70
3.2.1 Subfracciones de la fracción flagelar definidas por un anticuerpo monoclonal anti-FF-ISCOMS	72
3.2.2 Respuesta linfoproliferativa inducida por las subfracciones de la FF en esplenocitos de ratones no inmunes	73
3.2.3 Efecto inhibitorio del Ag 123 sobre la respuesta proliferativa mediada por Concanavalina A y FT	74
3.2.4 Respuesta linfoproliferativa inducida por las subfracciones de la FF en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con FF-ISCOMS	74
3.2.5 Efecto de un anticuerpo anti-TGF- β sobre la supresión de la proliferación mediada por el Ag 123.	75
3.2.6 El Ag 123 estimula la producción de TGF- β <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	76
3.2.7 Determinación de la secuencia de aminoácidos de péptidos producidos por digestión en gel de dos proteínas presentes en el Ag 123	76
3.2.8 Un anticuerpo anti-AFP humana precipita 2 proteínas de <i>T. cruzi</i> reconocidas por TC2C123	77
3.3 Tercera parte	
Comparación entre la respuesta inmune inducida por la fracción flagelar y la estimulada por la fracción flagelar depletada del antígeno inmunosupresor 123	90

3.3.1 Comparación entre la respuesta de anticuerpos inducida por la fracción flagelar y la fracción flagelar depletada del Ag 123 (FT)	91
3.3.2 Respuesta inmune mediada por células inducida por FF y FT	92
3.3.3 Niveles de protección conferidos por FT/m y FF/m ante un desafío parasitario	95
4. DISCUSION	111
5. BIBLIOGRAFIA	129

Introducción

1. INTRODUCCION

1.1 El problema

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Estadísticas realizadas por la Organización Mundial de la Salud señalan que entre 16 a 18 millones de personas están infectadas con este parásito en el continente americano (WHO, 1991). El área de prevalencia de la enfermedad se extiende desde el sur de los Estados Unidos (Zeledón, 1972) hasta el sur de la República Argentina (Bonet, 1972) y Chile (Schenone *et al.*, 1972). Sin embargo, la enfermedad cobra mayor importancia en América de Sur, debido a la gran extensión de las zonas endémicas. Estas áreas más afectadas se encuentran en zonas rurales, caracterizadas por viviendas humildes que favorecen el alojamiento de los insectos vectores. La transmisión vectorial es la principal vía de infección para el hombre, por lo cual el control del vector constituye un importante mecanismo profiláctico. La educación sanitaria y la mejora de la vivienda contribuyen en gran medida a este control. El tratamiento con insecticidas en las viviendas y peridomicilios de zonas endémicas constituye una metodología eficiente, especialmente cuando la comunidad participa en la vigilancia epidemiológica (Paulone *et al.*, 1987, Segura *et al.*, 1993).

Se conocen mas de 80 especies de insectos capaces de transmitir la enfermedad de Chagas (Zeledón, 1972). Estos insectos pertenecen a la familia Reduviidae y la subfamilia Triatominae. En la infección natural estos insectos hematófagos se alimentan sobre distintos vertebrados y depositan heces conteniendo tripomastigotes metacíclicos después de completar una comida. El parásito penetra así,

atravesando las superficies de las mucosas. Ejemplos de vectores eficientes son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*. Otras vías de infección son la transfusión sanguínea, que representa un factor importante de riesgo sobre todo en zonas endémicas (Cerisola *et al.*, 1972), los transplantes de órganos y la transmisión congénita (connatal), de menor frecuencia, asociada con nacimientos prematuros (Schmuñis & Szarfam, 1977).

1.2 El parásito

El *Trypanosoma cruzi* posee un complicado ciclo de vida en el cual pueden distinguirse cuatro estadios, dos de ellos presentes en el insecto vector y los otros dos en el mamífero huésped. Una vez que el vector se alimenta sobre un mamífero infectado, ingiriendo sangre que contiene tripomastigotes sanguíneos, los parásitos se transforman en epimastigotes, capaces de replicarse en el tracto medio intestinal del insecto. Semanas más tarde, estos epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infectivos en la ampolla rectal y son depositados durante una nueva alimentación, contaminando así nuevos mamíferos. Los tripomastigotes, penetran en las células blanco y se diferencian en amastigotes que son la forma intracelular y replicativa del parásito en el huésped definitivo. Después de varios ciclos de replicación, los amastigotes se transforman en tripomastigotes sanguíneos que son liberados a la circulación provocando la lisis celular.

El *T. cruzi* puede invadir una amplia variedad de células como por ejemplo macrófagos, otras células fagocíticas no profesionales, células de músculo cardíaco y esquelético y hasta células del sistema nervioso central (Andrade, 1991). El proceso de entrada puede ser

dividido en tres etapas: la adherencia del parásito a la membrana plasmática celular, la internalización del parásito gracias a la formación de una vacuola y finalmente el escape del parásito de la vacuola al citoplasma celular (Hall, 1993). Pese a la gran variedad de células susceptibles a la infección con *T. cruzi*, hay numerosas evidencias indicando que existen estructuras en la superficie de la célula huésped que están involucradas en el reconocimiento del parásito (Hall, 1993). La habilidad del *T. cruzi* reside en unirse a componentes ubicuos como algunas proteínas y carbohidratos presentes en la superficie celular. En particular, moléculas de ácido siálico son importantes para el reconocimiento del parásito en células no fagocíticas (Schenkman *et al.*, 1993). Se han descrito también varias proteínas de *T. cruzi* involucradas en el reconocimiento y adherencia a la célula blanco. Entre ellas podemos citar la proteína de 85 kDa de tripomastigotes (Alves, 1986) y la penetrina, una proteína de 60 kDa que se une a glicosaminoglicanos y colágeno promoviendo la adhesión del parásito a fibroblastos (Ortega-Barria & Pereira, 1991). Otra proteína de tripomastigotes implicada en la entrada del parásito es la enzima neuraminidasa/*trans*-sialidasa (Schenkman *et al.*, 1992a). De hecho, anticuerpos dirigidos contra un epítopo llamado Ssp-3 que resulta de la transferencia de ácido siálico de glicoproteínas del huésped a moléculas de superficie del parásito, bloquean la invasión a la célula blanco (Schenkman *et al.*, 1992b, Schenkman *et al.*, 1994).

La mayoría de las evidencias indican que el *T. cruzi* entra a los macrófagos mediante a un proceso de fagocitosis (Hall, 1993). Sin embargo algunos autores sugieren que la internalización ocurre a través de un mecanismo dirigido por el parásito (Kipnis *et al.*, 1979). Aunque el proceso de entrada no se conoce por completo en células no fagocíticas o fagocitos no profesionales, existe un consenso general

que la entrada del parásito en todas las células susceptibles está invariablemente acompañada por la formación de una vacuola unida a la membrana (Hall, 1993).

Después de 1 a 2 horas de ocurrida la entrada, los tripomastigotes infectivos escapan de la vacuola e ingresan en el citoplasma celular. La ruptura de la membrana vacuolar se inicia con la formación de poros. El proceso de escape del *T. cruzi* de la vacuola requiere acidificación (Ley *et al.*, 1990) y está asociado con la liberación de una proteína formadora de poro, llamada Tc-TOX, que es antigénicamente similar al componente C9 de la cascada del complemento y a la perforina (Andrews *et al.*, 1990). Se postula que el parásito se protege de la acción de esta proteína mediante la incorporación de residuos de ácido siálico sobre su superficie gracias a la actividad de la enzima neuraminidasa/*trans*-sialidasa (Hall., 1993, Schauer, 1985).

1.3 La enfermedad

Desde el punto de vista clínico la enfermedad de Chagas puede ser dividida en tres etapas: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda, que transcurre durante la primoinfección, se caracteriza por una parasitemia patente y por ser asintomática, pasando inadvertida en la mayoría de los casos. Sin embargo, cuando se presentan síntomas clínicos, la enfermedad es letal en el 1% de los casos (Segura & Ruiz, 1993). Algunas de las manifestaciones clínicas presentes en pacientes chagásicos agudos son fiebre, formación de edemas faciales (como el signo de Romaña) y en las extremidades inferiores y linfadenopatía generalizada. Pueden observarse también irritabilidad, cefalgias y mialgias, astenia, anorexia y en algunas ocasiones somnolencia (Brener

& Andrade, 1979). El Chagas agudo se resuelve generalmente entre 4 a 8 semanas después de producida la infección y los pacientes ingresan en la fase indeterminada de la enfermedad. Durante este período los pacientes son asintomáticos, presentan parasitemias subpatentes y anticuerpos circulantes contra el *T. cruzi*.

Finalmente, años o bien décadas después de la infección una proporción variable de las personas infectadas desarrolla la sintomatología propia al período crónico de la enfermedad, caracterizada principalmente por miocarditis, meningoencefalitis y lesiones del sistema autónomo del intestino. El órgano más afectado es el corazón observándose agrandamiento del mismo debido a dilatación e hipertrofia. Las manifestaciones clínicas más comunes incluyen arritmias debidas a bloqueo de rama derecha, disfunción autonómica, insuficiencia cardíaca y complicaciones tromboembólicas (Rosenbaum *et al.*, 1968). Pueden presentarse aneurismas distales en el ventrículo izquierdo debido a problemas relacionados con la conducción. Algunos chagásicos crónicos desarrollan también megacolon y megaesófago debido principalmente a la destrucción neuronal del sistema autónomo (Brenner & Andrade, 1979). El resultado final de la enfermedad puede desencadenar la muerte súbita o la insuficiencia cardíaca congestiva (Rosenbaum, 1964). Hasta el momento no se conocen completamente los mecanismos etiopatológicos responsables del Chagas crónico.

1.4 El *Trypanosoma cruzi* versus la respuesta inmune del huésped

La respuesta inmune contra el *Trypanosoma cruzi* es un fenómeno particularmente complejo. Dos aspectos diferentes pero interrelacionados de esta respuesta han recibido considerable atención durante los últimos años. Uno de ellos consiste en la serie de

desórdenes inmunológicos, tales como la activación policlonal y la marcada inmunosupresión que tienen lugar durante estadíos tempranos de la infección temprana con el parásito. El otro aspecto ha sido la caracterización del tipo de inmunidad necesaria para controlar la infección, ya sea analizando la naturaleza de los factores inmunológicos involucrados en dicha respuesta, o enfocando la investigación hacia la búsqueda de antígenos parasitarios que confieran protección contra el parásito. El entendimiento de la naturaleza de estos fenómenos es de suma importancia si se desea formular una vacuna eficiente contra el *T. cruzi*.

Sumado a estos mecanismos involucrados en la eliminación del parásito, otros fenómenos inmunológicos provocados por la infección con *T. cruzi* desencadenan procesos relacionados con el desarrollo de patología y autoinmunidad, evidentes principalmente durante la fase crónica de la enfermedad.

1.4.1 Activación policlonal e inmunosupresión

Durante las 2 primeras semanas de la infección con *T. cruzi* se produce una importante activación policlonal (Ortiz-Ortiz *et al.*, 1980). Más del 65 % de los linfocitos presentes en nódulos linfáticos y en el bazo se encuentran en ciclo mitótico. Se ha observado también una transformación blástica masiva de todos los tipos de células linfoideas (linfocitos B, T CD4⁺ y CD8⁺) en estos órganos (Minoprio *et al.*, 1986a). Se detectan también gran cantidad de células secretoras de inmunoglobulinas (D'Imperio Lima *et al.*, 1985) y la actividad de linfocitos T citotóxicos desarrolla un considerable aumento (Minoprio, *et al.*, 1986b). Estas respuestas son suprimidas mediante el tratamiento con anticuerpos anti-L3T4 en ratones infectados con *T. cruzi*

(Minoprio *et al.*, 1987), indicando que la población de linfocitos T CD4⁺ es al menos en parte responsable de este desorden. Algunos autores sostienen que es este fenómeno de activación policlonal el que trae como consecuencia el estado de inmunosupresión ulterior (Minoprio, 1991). Más aún, se postula también que este fenómeno podría ser la causa original de los procesos autoinmunes relacionados con la patología que se desarrolla en la enfermedad crónica (Hontebeyrie, 1991).

Tanto en el humano como en modelos experimentales murinos la infección con el *T. cruzi* está acompañada por un profundo estado de inmunosupresión (Clinton *et al.*, 1975, Voltarelli *et al.*, 1987). Este desorden es particularmente evidente durante la fase aguda de la enfermedad. Se ha postulado que este fenómeno tiene lugar para facilitar la diseminación del parásito en el mamífero huésped.

Diferentes fenómenos son concomitantes con este estado de inmunosupresión que ocurre durante etapas tempranas de la infección. Se ha observado por ejemplo una deficiencia en la función de las células T, tanto en su actividad inductora (colaboradora) para la producción de anticuerpos específicos contra el parásito (Cunningham *et al.*, 1978, Cunningham *et al.*, 1980) como en su capacidad efectora (respuesta citotóxica) (Plata, 1985). Además, los esplenocitos de ratones infectados poseen una capacidad limitada y reducida para producir IL-2, evidente principalmente a las 3 semanas post-infección (Rottenberg *et al.*, 1989). Esta incapacidad de producir IL-2 no se debería a una deficiencia de las células presentadoras de antígeno en segregar IL-1 (citoquina requerida para inducir la producción de IL-2 por células T), ni tampoco a la ausencia de células productoras de IL-2 (Tarleton, 1988a). Por el contrario, algunas evidencias experimentales

señalan que esta disminución en la producción de IL-2 estaría regulada por poblaciones de células supresoras (Tarleton, 1988b).

No sólo la producción de IL-2 se encuentra alterada durante la infección con *T. cruzi*. Se ha observado también que el parásito suprime la expresión de las cadenas α (p55) y β (p75) del receptor de IL-2 en linfocitos activados (Kierszenbaum & Szein, 1992, Kierszenbaum *et al.*, 1989), tanto *in vivo* como *in vitro*. La expresión de otras moléculas de superficie, involucradas en la activación temprana de los linfocitos, tales como el receptor para células T (Szein & Kierszenbaum, 1992), CD 3, CD 4 y CD 8 (Szein *et al.*, 1990) disminuye también en células periféricas mononucleares cuando son incubadas en presencia del parásito.

Algunos estudios indican que ciertas poblaciones de macrófagos podrían ser al menos en parte responsables de algunas de las respuestas supresivas que se observan durante la infección aguda. Por ejemplo, Cerrone & Kuhn (1991) describieron (usando la técnica de análisis por dilución límite) dos poblaciones de macrófagos supresivos presentes en bazos de ratones infectados con *T. cruzi*. Una de estas poblaciones suprime tanto respuestas específicas primarias como mitogénicas, mientras que la otra es capaz de suprimir la respuesta de linfocitos T activados mediante la inhibición de la producción de IL-2 (Cerrone & Kuhn, 1991)

El rol de las citoquinas en la inmunosupresión y en la susceptibilidad a infecciones ha empezado a estudiarse más en profundidad durante los últimos años, sobre todo después del hallazgo de que existen dos subpoblaciones de linfocitos T colaboradores (T_H) $CD4^+$ caracterizados por sus patrones de secreción de citoquinas (Mosmann *et al.*, 1986, Sad & Mosmana, 1994). Estas dos poblaciones denominadas T_{H1} y T_{H2} se regulan mutuamente,

produciendo citoquinas capaces de suprimir la proliferación, la síntesis y los efectos de las citoquinas de la subpoblación opuesta. Mientras las células T_{H1} secretan IL-2 e IFN- γ , las T_{H2} producen IL-4 e IL-10 (Figura 1). La IL-4 estimula la generación de células T_{H2} efectoras e inhibe el desarrollo de células T_{H1} (Swain *et al.*, 1990). La IL-10 por su parte, suprime la expresión de IL-2 e IFN- γ en células T_{H1} y CD 8⁺ (Mosmann *et al.*, 1991, Mosmann & Moore 1991). Estas dos últimas citoquinas, así como también el TGF- β influyen el curso de distintas infecciones parasitarias y virales disminuyendo la respuesta inmune mediada por células (Sher *et al.*, 1992).

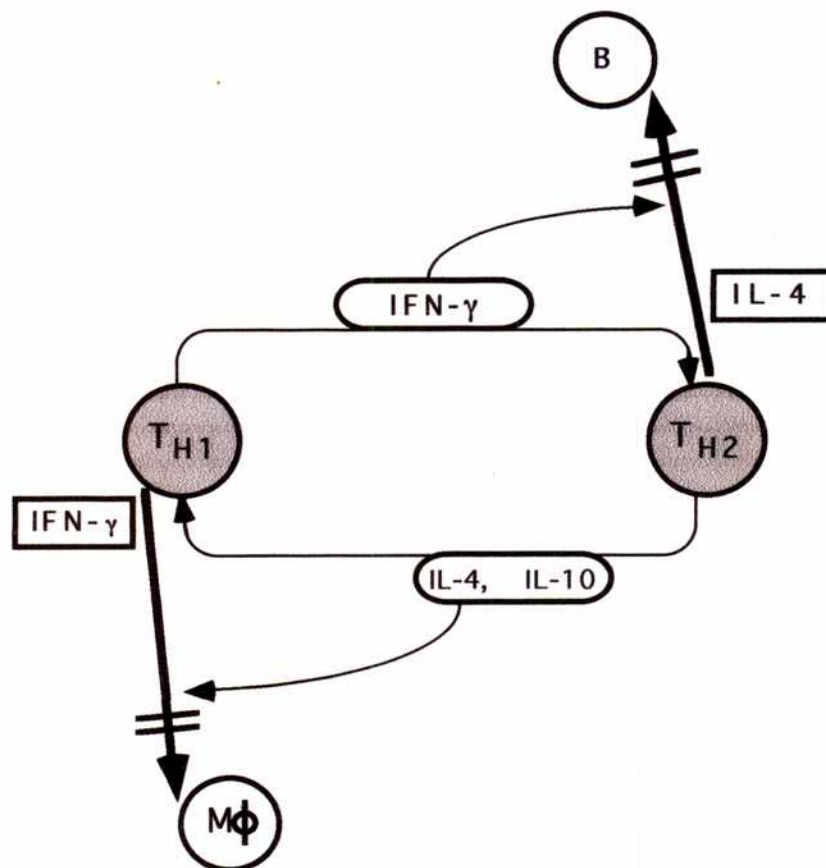


Figura 1: Regulación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺. Las líneas curvas y finas representan efectos inhibitorios de las citoquinas y las líneas rectas y gruesas efectos estimulatorios.

El TGF- β posee una amplia gama de efectos inhibitorios (revisado en Roberts & Sporn, 1990), como por ejemplo la supresión de la proliferación de linfocitos B y T (Fox *et al.*, 1992, Fox *et al.*, 1992.), disminución de la expresión del receptor para IL-2 (Bosco *et al.*, 1994, Okino *et al.*, 1993), e inhibición de la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase II estimulada por IFN- γ (Czarniecki *et al.*, 1988). El TGF- β también antagoniza los efectos y disminuye la producción de otras citoquinas como IL-1, TNF e IFN- γ (Roberts & Sporn, 1990) y bloquea la activación de macrófagos (Ding *et al.*, 1990).

Recientemente se ha descrito que durante la infección con *T. cruzi* estas citoquinas inhibitorias disminuyen el control intracelular de la infección a nivel de los macrófagos. Tanto el TGF- β (Silva *et al.*, 1991) como la IL-10 (Silva *et al.*, 1992) son producidos durante la infección aguda con *T. cruzi* y suprimen la capacidad de macrófagos activados con IFN- γ de inhibir la replicación intracelular del parásito. Mas aún, se ha documentado que ambas citoquinas median susceptibilidad, exacerbando los niveles de parasitemia y mortalidad durante la infección aguda (Silva *et al.*, 1991, Reed *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha observado que la administración *in vivo* de anticuerpos monoclonales anti-IL-4 aumenta la resistencia de ratones infectados con las cepas Tuhahuen o RA del *T. cruzi* (Petray *et al.*, 1993).

Aunque como se ha descrito, se conocen un número importante de fenómenos inmunosupresivos que tienen lugar durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, todavía no se ha determinado cómo el parásito provoca estas respuestas. Se ha reportado sin embargo, que una fracción subcelular conteniendo principalmente proteínas de epimastigotes (FAd) suprime la respuestas humoral y de

hipersensibilidad tardía a glóbulos rojos de carnero (Corsini *et al.*, 1980) en ratones BALB/c. Trabajos más recientes indican que un factor (TIF) presente en sobrenadantes de cultivo de tripomastigotes posee actividad inmunosupresora, inhibiendo la proliferación de células sanguíneas periféricas mononucleares estimuladas con fitohemaglutinina, así como también la expresión del receptor de IL-2 (Mejia Lopez *et al.*, 1993, Kierszenbaum *et al.*, 1994). Este factor podría tratarse de una molécula proteica, ya que el tratamiento de TIF con proteasas anula la actividad supresiva.

1.4.2 Mecanismos inmunológicos involucrados en la resistencia al *T. cruzi*

La naturaleza de los factores involucrados en la resistencia al *T. cruzi* ha sido estudiada extensamente. Tanto la respuesta humoral como la mediada por células intervienen en el control inmunológico de la infección. Uno de estos mecanismos de control es la producción de anticuerpos líticos, capaces de lisar tripomastigotes en presencia de complemento (Kretti & Brener, 1982). Estos anticuerpos no son sólo responsables de la lisis extracelular de los tripomastigotes, sino que también favorecen la internalización del parásito en células fagocíticas (Lages-Silva *et al.*, 1987), y la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Lima *et al.*, 1985.)

Otro mecanismo de control está dado por los anticuerpos anti-Gal α 1 \rightarrow 3Gal, que son un componente normal del suero y constituyen el 1 % de las IgG circulantes en humanos. Durante estadios tempranos de la infección con *T. cruzi* el título de estos anticuerpos aumenta de 20 a 30 veces con respecto a individuos normales. Se ha descrito que estos anticuerpos provocan la lisis directa del parásito

independientemente de la presencia de complemento (Gazzinelli *et al.*, 1991). Esta actividad lítica puede ser inhibida por carbohidratos específicos, lo que indicaría que este fenómeno está relacionado con la interacción de estos anticuerpos con epítopes glucídicos presentes en la superficie del *T. cruzi*.

La respuesta inmune celular juega un papel preponderante en la inmunidad contra el parásito. Diferentes tipos celulares parecen estar involucrados en la resistencia. Se ha reportado que la depleción *in vivo* de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, así como también de células NK en ratones aumenta los niveles de parasitemia y mortalidad durante la infección aguda con el *T. cruzi* (Rottenberg *et al.*, 1988). Es más, el tratamiento de ratones con anticuerpos monoclonales anti-CD8 resulta en un aumento de la susceptibilidad tanto en cepas de ratones resistentes como susceptibles y revierte la inmunidad conferida por vacunación en ratones infectados con *T. cruzi* (Tarleton, 1990). Dos de las actividades principales de las células CD8⁺ son la producción de citoquinas (en particular IFN- γ) y la función citotóxica. Linfocitos T CD8⁺ de ratones crónicamente infectados poseen actividad citotóxica antígeno-específica contra células blanco infectadas con *T. cruzi* (Nickell *et al.*, 1993) lo que indica que el aumento de susceptibilidad observado al eliminar esta población celular se debería a una disminución de la actividad citotóxica. Por el contrario, la depleción *in vivo* de esta población celular no modifica los niveles de IFN- γ en el suero (Tarleton, 1990). Además, la contribución de las células CD8⁺ a la producción de total IFN- γ durante la infección aguda en ratones es menor al 20 % (Tarleton, 1991).

La depleción de linfocitos T CD4⁺ resulta en una inhibición de las respuestas celular y de anticuerpos contra el *T. cruzi* y en un considerable aumento de la parasitemia (Rottenberg *et al.*, 1992) y la

mortalidad ante un desafío parasitario (Araujo, 1989). El tratamiento con anticuerpos anti-CD4 inhibe las respuestas IgG pero no las IgM en ratones infectados (Rottemberg *et al.*, 1992), lo que sugiere que una disminución en la actividad colaboradora estaría relacionada con el aumento en la susceptibilidad a la infección observado al remover esta población celular.

El rol de las citoquinas en el desarrollo de la infección se ha caracterizado sólo parcialmente. Las evidencias encontradas hasta el presente plantean una situación un poco más complicada que en otras infecciones como por ejemplo leishmaniasis (Miralles *et al.*, 1994) en donde las células T_{H1} y T_{H2}, junto con sus respectivas citoquinas, se relacionan estrechamente a resistencia y susceptibilidad, respectivamente. El efecto de la IL-4 durante la infección es controvertido. Se ha descrito que la IL-4 aumenta la ingestión y la muerte intracelular del parásito en células fagocíticas *in vitro* (Wirth *et al.*, 1989). Sin embargo, mientras algunos autores la señalan como un marcador de susceptibilidad (Hoft *et al.*, 1993), otros trabajos realizados en ratones BALB-Xid, resistentes al *T. cruzi*, muestran que estos animales presentan los mismos niveles de IL-4 durante la infección con el parásito que la cepa susceptible (BALB/c) (Minoprio *et al.*, 1993). Los ratones Xid carecen de linfocitos B CD5⁺, (Herzenberg *et al.*, 1986) población celular involucrada en la producción de IL-10 *in vivo* (O'Garra *et al.*, 1992). Por este motivo, se postula que la resistencia de estos animales se debería a una disminución en los niveles de IL-10, que traería como consecuencia un aumento en la producción de citoquinas de células T_{H1} (IFN- γ e IL-2) (Minoprio *et al.*, 1993). Otros autores han señalado también el rol de la IL-10 en la susceptibilidad a la infección (Silva *et al.*, 1992, Reed *et al.*, 1994).

Aunque se ha descrito que la producción de IL-2 disminuye durante la fase aguda (Rottenberg *et al.*, 1989), y que su adición *in vitro* revierte la inmunosupresión causada por el *T. cruzi* (Reed *et al.*, 1984, Tarleton & Kuhn, 1984) su rol en la inmunidad contra el parásito no se ha esclarecido por completo. La administración *in vivo* de IL-2 recombinante no modifica los niveles de mortalidad y sobrevivencia de ratones BALB/c con respecto a animales control (Rottenberg *et al.*, 1989), mientras que sí disminuye la parasitemia y retarda la mortalidad en ratones C3H (Choromanski & Kuhn, 1985). Por otro lado, linfocitos de ratones BALB/c (sensibles) infectados con *T. cruzi*, producen idénticos niveles de IL-2 que linfocitos de ratones C57BL6/J (resistentes) (Hoft *et al.*, 1993). Sin embargo, los niveles de ARNm de IL-2 en esplenocitos de ratones BALB-Xid son superiores a los encontrados en esplenocitos de la cepa BALB/c (Minoprio *et al.*, 1993).

Pese a las discrepancias señaladas con las citoquinas anteriores, la situación parece esclarecerse en el caso del IFN- γ . Numerosos estudios indican que el IFN- γ juega un papel principal en la resistencia y la inducción de protección contra el parásito. La administración *in vivo* de IFN- γ a ratones BALB/c disminuye la parasitemia y previene la muerte durante una infección parasitaria (Reed, 1988). Además, el tratamiento con anticuerpos anti-IFN- γ en ratones infectados aumenta los niveles de parasitemia y las tasas de mortalidad (Torrice *et al.*, 1991, Petray *et al.*, 1993, Silva *et al.*, 1992). Mas aún, células provenientes de cepas de ratones resistentes al *T. cruzi*, como B6D2, C57BL6/J y BALB-Xid, producen niveles significativamente superiores de IFN- γ que las cepas sensibles durante la infección con el parásito (Silva *et al.*, 1992, Hoft *et al.*, 1993, Minoprio *et al.*, 1993). El IFN- γ actúa activando macrófagos (Pace *et al.*, 1983, Wirth *et al.*,

1985), induciendo de esta manera inhibición de la replicación y aumento de la muerte intracelular del parásito mediante la activación de estallido respiratorio celular, que provoca la secreción de derivados del oxígeno capaces de destruir rápidamente al parásito por mecanismos de peroxidación en lípidos (Hughes, 1988). Trabajos recientes indican que el IFN- γ induce también actividad tripanomicida mediante la producción de óxido nítrico (NO) (Petray *et al.*, 1994, Muñoz *et al.*, 1992). Esta actividad del IFN- γ es sinergizada por TNF- α (Muñoz *et al.*, 1992). Esta última citoquina había sido implicada previamente en la inhibición de la multiplicación de tripomastigotes sanguíneos en macrófagos peritoneales murinos (De Titto *et al.*, 1986). Otra citoquina con actividad semejante es el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) que provoca la inhibición de la replicación del parásito, aumentando remarcablemente la liberación de peróxido de hidrógeno (Reed *et al.*, 1990).

La tabla I resume las principales funciones de las citoquinas relacionadas con la infección con el *T. cruzi*.

Tabla I: Origen y función de las citoquinas

Citoquina	Origen	Funciones
IL-1	Macrófagos, monocitos, fibroblastos, células endoteliales y keratinocitos	Estimula la proliferación de células B y T, inducción de IL-6, TNF y proteínas de fase aguda, activa células NK e interviene en procesos inflamatorios.
IL-2	Células T	Estimula la proliferación de células T y B activadas, aumenta la actividad citotóxica y de células NK y la secreción de citoquinas.
IL-4	Células T, mastocitos y basófilos	Promueve la diferenciación de células T _{H2} , proliferación y diferenciación de células B y secreción de IgE. Inhibe actividades inducidas por IFN- γ , y la producción de IL-12.
IL-5	Células T y mastocitos	Estimula el crecimiento y diferenciación de eosinófilos, y la proliferación de células B activadas.
IL-6	Células T, monocitos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales	Estimula el crecimiento y diferenciación de células B y T, induce proteínas de fase aguda e interviene en procesos inflamatorios.
IL-10	Células B y T, monocitos y macrófagos	Suprime la actividad de macrófagos y la producción de IL-12 e IFN- γ .
IL-12	Células B, monocitos y macrófagos	Estimula la actividad de células NK, promueve la diferenciación de células T _{H1} .

GM-CSF	Células T, macrófagos, fibroblastos, mastocitos y células endoteliales	Estimula el crecimiento de granulocitos y colonias de macrófagos, activa monocitos y macrófagos.
G-CSF	Fibroblastos, células endoteliales y macrófagos	Estimula la maduración de granulocitos y aumenta la producción de superóxidos en neutrófilos.
IFN- γ	Linfocitos T activados y células NK	Promueve el desarrollo de células T _{H1} , estimula la activación de macrófagos, la función citotóxica, la actividad de células NK y la secreción de IgG _{2a} . Inhibe las funciones de IL-4
TNF- α	Células T y macrófagos	Actividad tumoricida, induce la producción de IFN- γ , IL-1, IL-6 y proteínas de fase aguda.
TGF- β	Células B, T y macrófagos	Inhibe de la proliferación de células B, T y timocitos, suprime la actividad de células NK, antagoniza efectos de IL-1, IL-2, IFN- γ , TNF y estimula la secreción de IgA.

1.4.3. Patogénesis y autoinmunidad

El evento más dramático en la patogénesis de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de la cardiopatía, producido después de un prolongado período asintomático y sin aparentes cambios en la agresividad del parásito. Un importante número de evidencias indican que este daño se debe a la participación de mecanismos inmunológicos.

La observación de que la transferencia pasiva de linfocitos T CD4⁺ es capaz de reproducir los daños tisulares característicos de la fase crónica de la enfermedad, indica que éstas células juegan un rol en el desarrollo de la patología (Laguens *et al.*, 1981, Said *et al.*, 1985). En efecto, líneas celulares de linfocitos T CD4⁺ específicos para *T. cruzi* generadas *in vitro*, inducen la formación de infiltrados inflamatorios y provocan respuestas de hipersensibilidad tardía cuando son transferidas a ratones normales (Ben Younes-Chenoufi *et al.*, 1988). Sin embargo como se ha desarrollado en la sección 1.4.2, la células T CD4⁺ estarían también involucradas en el control inmunológico de la infección. La identificación de las subpoblaciones TH1 y TH2, permitió esclarecer esta presunta discrepancia. De hecho, la línea celular G-05, derivada de nódulos linfáticos de ratones crónicamente infectados y responsable de la transferencia de patología, mostró ser del subtipo TH2, secretando IL-4 pero no IL-2 ni IFN- γ (Hontebeyrie *et al.*, 1991).

Existen evidencias crecientes que señalan que la patología de la fase crónica se debe a procesos de naturaleza autoinmune. Se postulan por lo menos dos posibles explicaciones para la generación de autoinmunidad en la enfermedad de Chagas. Una de ellas sería la reactividad cruzada de antígenos del *T. cruzi* con algunos antígenos del huésped (Oldstone, 1987). La segunda hipótesis postula que la infección con el *T. cruzi* provoca desordenes inmunológicos que traerían como consecuencia la pérdida de tolerancia hacia antígenos propios (Petry & Van Voorhis, 1991). Se postula que la activación policlonal que tiene lugar durante la fase aguda de la infección jugaría algún papel en la pérdida de la tolerancia que precede al fenómeno autoinmune (Minoprio *et al.*, 1986) liberando clones reactivos con epitopes propios capaces de persistir por largos períodos en el huésped.

El *T. cruzi* expresa varios antígenos que "imitan" proteínas del huésped. El mimetismo molecular en la enfermedad de Chagas es evidente, ya que se han descrito anticuerpos y células T que muestran reactividad cruzada entre el *T. cruzi* y antígenos de mamíferos. Por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra el parásito que reaccionan con una proteína de 25 kDa del sarcolema del músculo cardíaco y estriado, se han asociado con la cardiopatía chagásica (Acosta *et al.*, 1983). Los sueros de chagásicos agudos y crónicos poseen anticuerpos que reconocen el endocardio y el inestercio del músculo estriado (Riberos-Santos *et al.*, 1979) y células de Schwann de nervio periférico (Cossio *et al.*, 1974). Además, se han reportado anticuerpos monoclonales reactivos con 2 proteínas de 58 y 38 kDa del *T. cruzi* y 2 proteínas equivalentes sobre tejido nervioso (Snary *et al.*, 1983). De manera similar, anticuerpos monoclonales preparados contra una fracción microsomal de epimastigotes reconocen estructuras sobre miocardio y músculo (Lauella, 1995).

Estos antígenos y otros (para revisión ver Petry & Van Voorhis, 1991) caracterizados hasta ahora apoyan la idea de que epitopes de *T. cruzi* "imitan" antígenos presentes en tejidos blanco provocando de esta manera patología durante la enfermedad crónica a través de un mecanismo autoinmune.

1.5 Antígenos del *T. cruzi* con propiedades protectoras

Aunque se han realizado numerosos intentos para desarrollar una vacuna contra la enfermedad de Chagas, hasta el presente no contamos con una preparación capaz de conferir una inmunidad esterilizante. Tampoco hay disponibles agentes terapéuticos eficaces y seguros para el tratamiento individual o masificado. Probablemente no

contemos con una vacuna eficiente contra el *T. cruzi* debido a que la mayor parte de los esfuerzos en este área se han concentrado en la obtención de inmunidad contra el patógeno, ignorando la inmunología del proceso infeccioso. De todos modos, se han descrito preparaciones antigénicas crudas y purificadas que protegen parcialmente contra la infección con *T. cruzi*.

Los primeros intentos para desarrollar una vacuna contra la enfermedad de Chagas consistían en la inmunización con parásitos muertos (Neal & Johnson, 1977), atenuados (Camargo *et al.*, 1991), inactivados químicamente (Andrews *et al.*, 1985) o irradiados (Kirchhoff & Hoft, 1990). De esta forma se lograba una disminución de la parasitemia y un aumento de la supervivencia de los animales inmunizados después de un desafío con *T. cruzi* con respecto a los controles.

Algunas fracciones subcelulares del parásito han mostrado también propiedades protectoras. En particular, preparaciones enriquecidas con componentes de membrana poseen un potencial importante como candidatos a vacunas, ya que estas proteínas son las primeras en encontrarse con el sistema inmune del huésped. Experimentos de inmunoprotección empleando fracciones subcelulares de epimastigotes de *T. cruzi* indicaron que una fracción que contiene principalmente antígenos de membrana y del flagelo induce protección parcial en animales de experimentación (Ruiz *et al.*, 1985). Usando *Bordetella pertussis* como adyuvante se observó que los ratones inmunizados con esta fracción flagelar (FF) presentaban ausencia de mortalidad, niveles más bajos de parasitemia y disminución de la histopatología después de un desafío con *T. cruzi* (Ruiz *et al.*, 1986). Esta capacidad protectora de la FF requiere sin embargo de la

administración de elevadas y numerosas dosis y la presencia de adyuvantes (Ruiz *et al.*, 1986).

El desarrollo de tecnologías tales como la producción de anticuerpos monoclonales y técnicas de biología molecular, permitió realizar una caracterización más exhaustiva del parásito y en consecuencia la purificación de algunos antígenos protectivos. Tal es el caso del Ag 4 de epimastigotes, purificado por inmunoafinidad a un anticuerpo monoclonal anti-fracción flagelar (Ruiz *et al.*, 1990) o de un grupo de glicoproteínas de 45-68 kDa reconocidas por un anticuerpo monoclonal de epimastigotes, que inducen elevadas respuestas humoral y celular, disminución de la parasitemia y aumento de la sobrevivencia ante un desafío parasitario (Araujo *et al.*, 1984, Araujo & Morein, 1991). Sin embargo, una proteína de 56 kDa, recientemente purificada a partir de las proteínas presentes en este último grupo induce sólo un retardo de la mortalidad con respecto a los controles no inmunizados (Harth *et al.*, 1994)

Gp 90 (Snary & Hudson, 1979), una proteína presente en todos los estadios del parásito confiere una protección duradera, detectable aún después de 6 meses de realizada la inmunización (Scott & Neal, 1984), cuando se administra con saponinas o adyuvante completo de Freund (Scott *et al.*, 1984). Sin embargo, esta protección tampoco es absoluta ya que los ratones desafiados mostraron xenodiagnósticos positivos varios meses después de realizada la infección (Scott & Snary, 1979). Otra glicoproteína, gp 72, involucrada en la diferenciación de los epimastigotes en tripomastigotes metacíclicos, protege a ratones cuando se desafían con este último estadio del parásito pero no cuando la infección se realiza con tripomastigotes sanguíneos (Snary, 1983).

Otra estrategia seguida para la identificación de componentes protectores ha sido el estudio y caracterización de productos de excreción-secreción (ESA) del parásito (Ouassi *et al.*, 1990). Se ha postulado que estos antígenos podrían intervenir en mecanismos de escape usados por el *T. cruzi* para eludir la respuesta inmune (Taibi *et al.*, 1993). Por lo tanto, su empleo en inmunizaciones podría inducir una respuesta capaz de neutralizar el desarrollo de estos mecanismos evasivos, aumentando de esta manera la eficiencia del sistema inmune para controlar la infección. Estudios realizados con sobrenadantes de cultivo de tripomastigotes de la cepa Y mostraron que estos productos de excreción inducen anticuerpos que reconocen 2 polipéptidos del parásito de 85 y 24 kDa y confieren una reducción de los niveles de parasitemia, acompañados de un 60 % de sobrevida en ratones BALB/c ante un desafío parasitario (Taibi *et al.*, 1993).

1.6 Vacunas contra infecciones persistentes

Existe un número importante de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos capaces de provocar una infección persistente. Ejemplos de tales microorganismos son los herpes virus, los retrovirus, y varios parásitos incluyendo a los tripanosomas americanos y a los africanos. Hasta el presente no existen vacunas contra tales patógenos, capaces de "convivir" con la respuesta inmune evocada por ellos mismos que en algunas ocasiones desarrolla mecanismos que favorecen su sobrevivencia en el huésped. Para obtener una vacuna contra estos microorganismos es fundamental entender el tipo de inmunidad necesaria para la obtención de una respuesta protectora. De esta manera, una vacuna puede ser diseñada para inducir preferencialmente un determinado tipo de respuesta inmune. Una formulación capaz de cumplir con este requisito debe poder modular el sistema inmunológico hacia la obtención de la respuesta deseada.

1.7 Adyuvantes como inmunomoduladores

Un adyuvante es un compuesto que potencia la respuesta inmune específica hacia un determinado antígeno. Clásicamente, el efecto de un adyuvante se medía como un incremento en la capacidad de evocar respuestas de anticuerpos y celulares hacia un antígeno dado. Sin embargo, en una visión moderna del adyuvante debe incluirse el concepto de inmunomodulación, que además de la magnitud de la respuesta inducida, considera los aspectos cualitativos de la misma. Estos aspectos cualitativos incluyen:

- la inducción de anticuerpos específicos de la subclase e isotipo de Ig deseada
- respuestas celulares específicas, considerando la producción de citoquinas y la respuesta T citotóxica
- la distribución de la respuesta en los distintos órganos del sistema inmune

Cualquiera de estos aspectos puede ser importante para obtener una inmunidad protectora, que es el objetivo primordial de una vacuna, ya que cada patógeno es único y diferente y en consecuencia el perfil de inmunidad requerido difiere de un caso a otro.

1.8 Sistemas adyuvantes

Generalmente, los adyuvantes pueden ser clasificados en particulados y no particulados.

La acción de algunos de los adyuvantes particulados se basa en un efecto "depósito", que permite la liberación lenta del antígeno, favoreciendo de esta manera una estimulación continua de sistema inmune. Ejemplos de tales adyuvantes son las sales de aluminio (Blagowechnsky, 1938, Jensen & Koch, 1988), que es el único tipo de adyuvante autorizado para el uso en humanos y las emulsiones oleosas (McKercher, 1986), como el adyuvante incompleto de Freund. Algunos estudios sugieren que estas sustancias podrían favorecer el desarrollo de una respuesta inmune de tipo TH2 (Schutze *et al.*, 1987, Bomford, 1980, White, 1976)

Otro tipo de adyuvantes particulados lo constituyen los liposomas (Allison & Gregoriadis, 1974), virosomas (Morein *et al.*, 1978), micelas y proteosomas (Zollinger *et al.*, 1979). Estos sistemas no actúan como inmunomoduladores, pero presentan las proteínas de

una manera multimérica lo que favorece la presentación antigénica (Morein *et al.*, 1978).

Los adyuvantes no particulados generalmente sí funcionan como inmunomoduladores. Por ejemplo, los lipopolisacáridos y sus derivados o los muramil dipéptidos (Ellouz *et al.*, 1974) y sus análogos (Bahr *et al.*, 1982, Chedid *et al.*, 1982), son potentes mitógenos de células B (Solow *et al.*, 1982) y estimulan la producción de IFN- γ (Tomai & Johnson, 1989, Ohta *et al.*, 1982, Damais *et al.*, 1978, Odean *et al.*, 1990).

Algunas citoquinas purificadas como por ejemplo IL-1 (Staruch & Wood, 1983), IL-2 e IFN- γ han sido también usadas como adyuvantes en algunos sistemas (revisado en Heath & Playfair, 1992). Aunque en la mayoría de los casos fueron efectivas y la respuesta inmune fue mejorada, su uso es controvertido porque poseen algunas limitaciones como la especificidad de especies y su corta vida media que requeriría una administración frecuente.

1.9 Presentación del antígeno en forma multimérica

Entre los factores que deben tomarse en cuenta para la formulación de una vacuna se encuentra la presentación física del antígeno. Se ha descrito que la inmunogenicidad de un antígeno puede aumentarse considerablemente si se presentan varias copias de la molécula en una misma partícula, es decir en forma multimérica (Morein & Simons, 1985). Esto se debe a que esta forma de presentación "imita" las estructuras de superficie de los microorganismos. Si este tipo de presentación es suplementada con la presencia de un adyuvante, la antigenicidad de la molécula puede ser potenciada varias veces.

1. 10 Complejos inmunoestimulantes (ISCOMS)

Las saponinas son glicósidos que contienen un esqueleto hidrofóbico de una estructura triterpenoide y una región hidrofílica correspondiente a 2 cadenas de hidratos de carbono compuestas por 8 a 12 monosacáridos (Higuchi *et al.*, 1988). El Quil A (Figura 2) es una saponina extraída de la corteza del árbol *Quillaja Saponaria* Molina que posee actividad adyuvante (Dalsgaard, 1974). En el año 1984, Morein *et al.* desarrollaron una nueva formulación para la presentación multimérica de antígenos: el complejo inmunoestimulante. Un complejo inmunoestimulante (ISCOM) es una estructura en forma de celda compuesta por Quil A, colesterol, fosfolípidos y proteínas (antígenos). Esta estructura presenta la ventaja de reunir la presentación multimérica del antígeno y la presencia de un potente adyuvante en una misma partícula.

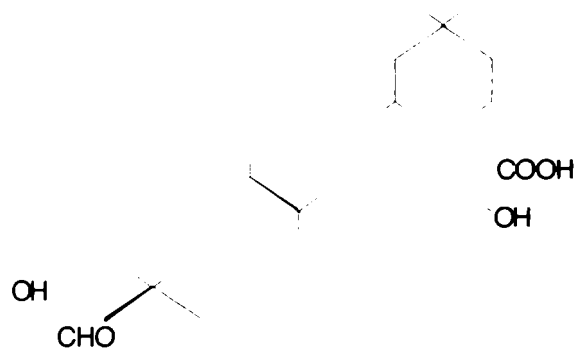


Figura 2: Estructura básica del Quil A.

Al microscopio electrónico los ISCOMS muestran una simetría icosaédrica, su tamaño es de aproximadamente 30-40 nm, y están

compuestos por subúnicas en forma de anillo de 12 nm (Ozel *et al.*, 1989, Kersten *et al.*, 1991).

Los ISCOMS son estructuras sumamente estables que permanecen inalteradas después de liofilización, soportan varios ciclos de congelamiento-descongelamiento y pueden ser almacenadas por largos períodos a 4 °C, aunque esto último depende en gran medida de la naturaleza del antígeno (Morein, *et al.*, 1995).

1.10.1 El componente adyuvante

Las propiedades adyuvantes de las saponinas fueron descriptas por primera vez por Ramon (Ramon, 1926) en el año 1926. En 1970, Dalsaagard demostró que la actividad adyuvante de las saponinas derivadas del árbol *Quillaja saponaria* Molina era superior que la del resto de las saponinas (Dalsgaard, 1970). El Quil A está constituido por varios triterpenoides que presentan unas pocas diferencias estructurales, y es la primera preparación de saponinas que se ha usado para la construcción de ISCOMS. Estudios posteriores basados en cromatografía líquida en fase reversa de alta resolución (HPLC) permitieron la separación del Quil A en 3 subfracciones: QH-A, QH-B y QH-C (Rönnerberg *et al.*, 1995). Estos 3 grupos de componentes poseen distintas propiedades en cuanto a su actividad adyuvante, su capacidad para la formación de ISCOMS y su toxicidad.

QH-A es el grupo más complejo, compuesto por una mezcla de triterpenoides. Posee una muy baja capacidad adyuvante, aunque es muy bueno para la formación de ISCOMS. Su toxicidad *in vitro* es baja (Rönnerberg *et al.*, 1995). QH-B muestra un doble pico en HPLC (Morein, *et al.*, 1995). Es un adyuvante sumamente poderoso, sin embargo presenta la mayor toxicidad de las 3 subfracciones obtenidas

(Morein, *et al.*, 1995). Por su parte QH-C, muestra 3 picos en HPLC y posee elevada capacidad adyuvante. Su administración a animales de experimentación demostró que es significativamente menos tóxico que QH-B (Rönnerberg *et al.*, 1995).

Actualmente se están estudiando combinaciones de estas subfracciones en distintas proporciones con el objeto de obtener un balance adecuado entre la capacidad adyuvante y la toxicidad.

1.10. 2 Formación del ISCOM

El proceso para la preparación de ISCOMS se basa en la solubilización de las proteínas en detergentes no iónicos, seguida de la adición del Quil A, el colesterol y algunos fosfolípidos (Lövgren & Morein, 1988). El Quil A y el colesterol se unen fuertemente mediante interacciones hidrofóbicas y "capturan" a las proteínas solubilizadas a medida que el detergente es removido, dando lugar a la formación de ISCOMS (Lövgren & Morein, 1988). En ausencia de proteínas el resultado es la matrix del ISCOM. Existen dos métodos para eliminar el detergente y consecuentemente armar ISCOMS: el método de centrifugación y el de diálisis. El método de centrifugación (Lövgren, 1987) se emplea cuando el detergente usado para la solubilización de las proteínas es no dializable. El método consiste en sembrar las proteínas en un gradiente de sacarosa formado por 2 capas. Una capa inferior que contiene Quil A, y una capa superior conteniendo detergentes tales como el Triton X-100 o el NP-40. Las proteínas son centrifugadas primero a través de la capa con Triton que retiene los lípidos y detergentes y pasan luego hacia la zona que contiene el Quil A. En esta zona, en ausencia de detergentes, el Quil A se asocia con la proteínas dando lugar a la formación de ISCOMS.

El método de diálisis se usa cuando la solubilización de las proteínas se hace con detergentes dializables, o cuando se trabaja con antígenos muy pequeños como para sedimentarlos en un gradiente de sacarosa en un tiempo aceptable (Lövgren, 1987). En este caso la mezcla conteniendo las proteínas solubilizadas, el Quil A, el colesterol y los lípidos es dializada durante 48 hs para eliminar el exceso de detergente y permitir el ensamblaje de los ISCOMS.

1.10.3 Naturaleza de los antígenos incluidos en ISCOMS

Los primeros ISCOMS descritos fueron preparados con proteínas de la envoltura de algunos virus. Estas proteínas poseen una región hidrofóbica que favorece la interacción con los fosfolípidos y el colesterol facilitando la formación de los ISCOMS.

Antígenos más hidrofílicos pueden ser forzados a exponer sus dominios hidrofóbicos ocultos en su estructura terciaria, mediante tratamientos desnaturalizantes suaves, como la exposición a pH bajos (Pyle *et al.*, 1989) o el tratamiento con urea (Morein *et al.*, 1990).

Cuando un antígeno es muy hidrofílico y carece de secuencias hidrofóbicas, debe realizarse algún tipo de modificación química que permita su conjugación a una matrix de ISCOM ya preparada (Sjölander *et al.*, 1991). Esto puede lograrse reemplazando en la preparación de la matrix la fosfatidilcolina con una cantidad igual de fosfatidiletanolamina (Lövgren & Morein, 1988), que posee un grupo amino disponible para la unión covalente. Otra alternativa es realizar una modificación química del antígeno uniéndole una "cola" hidrofóbica de ácidos grasos antes de realizar la incorporación en ISCOMS (Reid, 1992)

1. 11 Respuesta inmune inducida por ISCOMS

1.11.1 La interacción de los ISCOMS con las células presentadoras de antígeno

Las células presentadoras de antígeno pueden estimular células inmunocompetentes exhibiendo un antígeno procesado junto a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II, evocando así una respuesta de linfocitos T CD 8⁺ o CD 4⁺ respectivamente. Esto depende del procesamiento intracelular que sufre el antígeno. Las proteínas que son degradadas en el citosol por complejos de peptidasas denominados proteasomas, dan como resultado péptidos que son presentados con moléculas del MHC de clase I. Por el contrario, las proteínas que son procesadas dentro de endosomas se presentan junto a moléculas de MHC de clase II (Roitt, 1994).

Estudios de microscopía electrónica mostraron que ISCOMS conteniendo proteínas de virus de influenza se encuentran en vésiculas, principalmente endosomas o lisosomas, mientras que el mismo antígeno presentado en micelas no pudo ser detectado en estas estructuras (Villacres-Eriksson, 1993). Adentro de la célula los ISCOMS son capaces de adherirse a membranas, integrándose entre las capas lipídicas. De esta manera los antígenos presentes en ISCOMS son expuestos hacia ambos lados en una vesícula, es decir hacia el interior de la misma y también hacia el citosol (Villacres-Eriksson, 1993). De esta forma el antígeno es susceptible también al ataque por enzimas citosólicas. Mas aún, estudios morfométricos revelaron que después de la captación de ISCOMS de proteínas de influenza por macrófagos, el 60 % del antígeno se encuentra en el citosol, mientras

que el 40 % restante está asociado a membranas en vesículas intracelulares (Villacres-Eriksson, 1993). Estas observaciones podrían explicar el hecho de que los ISCOMS sean capaces de inducir respuestas dependientes de presentación del MHC de clase I (Heeg *et al.*, 1991) como también de clase II.

Las células fagocíticas mononucleares secretan varias citoquinas que son necesarias para la iniciación de la respuesta inmune. Se ha descrito que tanto los ISCOMS como su matrix inducen la producción de IL-1 por macrófagos peritoneales y esplénicos (Villacres *et al.*, 1993). Los ISCOMS estimulan la producción de IL-6 y en menor medida de GM-CSF y TNF- α (Villacres-Eriksson, 1993). Estos complejos evocan también un aumento en la expresión de las moléculas de MHC de clase II a través de un mecanismo dependiente de IFN- γ (Bergström *et al.*, 1992).

1.11.2 Activación de esplenocitos inducida por ISCOMS

Varios tipos de células presentadoras de antígeno, tales como, macrófagos, células dendríticas y células B preestimuladas con ISCOMS del virus de influenza estimulan la proliferación de esplenocitos provenientes de ratones no inmunes (Morein *et al.*, 1995). Mas aún, esta estimulación de la respuesta linfoproliferativa puede ser sinergizada por la adición de sobrenadantes de macrófagos peritoneales estimulados con ISCOMS. La adición de anticuerpos monoclonales anti-IL-1, IL-6, GM-CSF y TNF- α neutraliza parcialmente este efecto sinérgico sobre la respuesta proliferativa indicando que estas citoquinas estarían involucradas en la estimulación de la respuesta (Morein *et al.*, 1995). Hasta el momento se desconoce si este fenómeno se debe a una respuesta primaria provocada *in vitro*, o bien

a una activación oligoclonal. Sin embargo, la incapacidad de la matrix de ISCOMS (carente de antígenos) en provocar estas respuestas apoya la idea de una respuesta inmune primaria generada *in vitro*.

La inmunización con ISCOMS promueve el desarrollo de linfocitos T de memoria. Generalmente, la restimulación *in vitro* de esplenocitos de animales inmunizados realizada con ISCOMS induce respuestas superiores que al incubar con micelas (Villacres-Eriksson, 1993).

Los sobrenadantes de esplenocitos de animales inmunizados con ISCOMS contienen IL-2 e IFN- γ (Fossum *et al.*, 1990, Villacres-Eriksson *et al.*, 1992). Por otro lado, la inmunización con antígenos incorporados en micelas favorece el desarrollo de esplenocitos que secretan niveles de IL-10 significativamente más elevados que los observados al inmunizar con el mismo antígeno incluido en ISCOMS (Villacrés-Eriksson, 1995).

1.11.3 Respuesta de anticuerpos

Numerosos estudios mostraron la capacidad de los ISCOMS en inducir respuestas B (para revisión ver Morein & Åkerblom, 1992). La respuesta de anticuerpos inducida por ISCOMS se caracteriza por un clásico incremento inicial de anticuerpos IgM, seguido por una respuesta de IgG sostenida y duradera. Esta respuesta es generalmente de 5 a 10 veces mayor que la evocada por el mismo antígeno incluido en micelas o en ausencia de sistemas adyuvantes e involucra distintas subclases como IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgA e IgE (Villacres *et al.*, 1992), siendo generalmente los isotipos más abundantes IgG₁, IgG_{2a} (Morein *et al.*, 1995)

1.11.4 Respuesta de linfocitos T citotóxicos

Como se ha desarrollado en la sección 1.11.1, la inclusión de proteínas en ISCOMS permite su presentación antigénica a través de moléculas del MHC de clase I. En acuerdo con estos datos se ha observado que la administración de ISCOMS induce respuestas citotóxicas en varios modelos experimentales como por ejemplo con ISCOMS preparados con gp160 de HIV, proteínas del virus de influenza (Takahashi *et al.*, 1990), proteína F del virus del sarampión (van Binnendijk *et al.*, 1992) las proteínas de micobacteria (Zügel *et al.*, 1995) y ovoalbúmina (Mowat & Donachie, 1991).

1.11.5 Cinética y distribución de la respuesta inmune inducida por ISCOMS

Usando como modelo ISCOMS preparados con proteínas del virus de influenza se ha estudiado la cinética y la distribución en los distintos órganos del sistema inmune de las respuestas humoral y celular inducidas por los complejos.

Los antígenos de influenza incluidos en ISCOMS son distribuidos rápidamente desde el sitio de la inyección subcutánea a través de todo el cuerpo (Sjölander, comunicación personal). Esto indicaría que la capacidad adyuvante de los ISCOMS no se debería a un efecto "depósito" como se ha descrito para las emulsiones oleosas o las sales de aluminio. Si los ISCOMS se administran por vía intraperitoneal, son transportados rápidamente hacia el bazo (Watson *et al.*, 1989).

Después de la administración de ISCOMS por vía subcutánea se observa un incremento de la respuesta inmune celular caracterizado

por un aumento en la proliferación celular. La respuesta en el bazo se desarrolla mas lentamente que en los ganglios linfáticos pero es sostenida y dura mas de 3 meses (Morein *et al.*, 1995). Después de una segunda revacunación se observa una rápida expansión de células respondedoras en los ganglios linfáticos.

La respuesta primaria de anticuerpos inducida por la administración de ISCOMS de influenza, determinada como el número de células secretoras de anticuerpos mostró mayor desarrollo a nivel de los ganglios linfáticos, con un pico registrado a la semana de la inmunización (Sjölander, enviado para publicación). La administración de una segunda dosis, resulta en un marcado incremento en el número de células productoras de anticuerpos, tanto en el bazo como en los ganglios linfáticos (Morein *et al.*, 1995) y en un aumento en los niveles séricos de anticuerpos específicos.

1. 12 Inmunidad protectora inducida por ISCOMS

La primera preparación de ISCOMS que mostró inmunidad protectora fue contra el virus de influenza en ratones (Lövgren *et al.*, 1990) y en caballos (Mumford *et al.*, 1994). De hecho, la vacuna para caballos se encuentra disponible comercialmente en la actualidad. La tabla II resume la lista de vacunas experimentales basadas en ISCOMS que confieren protección ante un desafío infeccioso.

1.13 La matrix de ISCOMS como sistema adyuvante

Como se ha desarrollado en las secciones anteriores los ISCOMS constituyen una importante tecnología para el desarrollo de vacunas contra distintos agentes infecciosos. Sin embargo, una

limitación que pueden presentar es la dificultad para obtener suficiente cantidad de material incluido en los complejos, debido presumiblemente a la naturaleza del antígeno. Ante un problema de bajo rendimiento de incorporación una alternativa interesante es administrar la proteína usando matrix de ISCOMS como adyuvante.

La matrix estimula la producción de IL-1, tanto en su forma soluble como asociada a membranas, en esplenocitos provenientes de ratones no inmunes o inmunizados. De hecho, esta respuesta es ligeramente superior a la inducida por ISCOMS portando proteínas específicas (Villacres *et al.*, 1993). Las células adherentes presentes en la preparación de esplenocitos serían las responsables de esta respuesta.

Inmunizaciones con matrix inducen una actividad adyuvante no específica, reflejada en un aumento de la proliferación espontánea de células linfáticas extraídas de ratones una semana después del tratamiento *in vivo* (Fossum *et al.*, 1990). Este efecto se debe presumiblemente a la presencia del Quil A, ya que se han reportado respuestas de magnitud similar al administrar saponinas semipurificadas provenientes de Quillaja (Speijers *et al.*, 1988).

Inmunizaciones con enterovirus inactivado, usando matrix como adyuvante mostraron una respuesta de anticuerpos significativamente superior a la evocada por el mismo antígeno administrado con adyuvante de Freund o hidróxido de aluminio, confiriendo un 74 % de sobrevida ante un desafío infeccioso (Fohlman *et al.*, 1993)

Tabla II: Inmunidad protectora inducida por ISCOMS preparados con antígenos de distintos agentes infecciosos

Antígeno y microorganismo	Animal experimental	Enfermedad prevenida
Hemaglutinina y neuraminidasa del virus de influenza	Ratón	Neumonía
Hemaglutinina del virus del sarampión	Ratón	Encefalitis
Proteína de fusión del virus del sarampión	Foca	Encefalitis
Hemaglutinina y proteína de fusión del virus de moquillo canino	Perro	Infección letal
Proteína G del virus de la rabia	Ratón	Neumonía
Gp120 del virus de inmunodeficiencia simio	Mono	Infección letal
Gp125 del virus de inmunodeficiencia humano 2	Mono	Viremia
Proteína de envoltura del virus de la diarrea bovino	Oveja	Aborto
Gp70 del virus de leucemia felina	Gato	Viremia
Gp380 del virus Epstein-Barr	Mono	Tumor letal
Proteína de superficie de <i>Toxoplasma gondii</i>	Ratón	Infección letal

1.14 Objetivos

La fracción flagelar (FF) de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* adyuvada con *Bordetella pertussis* protege parcialmente a ratones BALB/c, provocando ausencia de mortalidad, niveles más bajos de parasitemia y disminución de la histopatología después de un desafío parasitario (Ruiz *et al.*, 1986). Esta capacidad protectora de la FF requiere sin embargo de la administración de elevadas y numerosas dosis (5 dosis de 100 µg) y es dependiente de la presencia de adyuvantes.

Enmarcados en estas evidencias los objetivos del presente estudio han sido:

- Preparación y caracterización de ISCOMS con la FF de *T. cruzi* con el objeto de aumentar su inmunogenicidad y consecuentemente disminuir la dosis requerida para conferir protección.
- Subfraccionamiento de la FF y análisis bioquímico e inmunológico de las subfracciones obtenidas, con el objeto de identificar componentes involucrados en la resistencia.
- Estudio comparativo entre la FF y las subfracciones obtenidas a partir de la misma en su capacidad de inducir respuestas inmunes humoral y celular y en mediar protección ante un desafío parasitario.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Cultivo del parásito

Se utilizó la cepa Tulahuén 2 de *Trypanosoma cruzi*. Los epimastigotes se cultivaron durante 7 días a 28°C en medio monofásico axénico conteniendo 5 g/l de extracto de hígado (Difco, Argentina), 4 g/l de extracto de corazón (Difco, Argentina), 3 g/l de extracto de carne (Difco, Argentina), 3 g/l de extracto de levadura (Difco, Argentina), 9 g/l de triptosa (Difco, Argentina), 4 g/l de dextrosa (Merck, Argentina), 10 g/l de Na₂HPO₄ (Merck, Argentina), 4 g/l de KCl (Merck, Argentina), 4 g/l de NaCl (Merck, Argentina), 0.02 g/l de hemina (Sigma, St. Louis, MO. USA).

2.2 Preparación de homogenato total del parásito y de la fracción flagelar

El homogenato total del parásito (HT) y la fracción flagelar (FF) se obtuvieron a partir de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuén. Los parásitos se cultivaron en medio monofásico y se cosecharon por centrifugación a 7500 rpm durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en una solución de sacarosa 0.25 M-ClK 5M y se recentrifugó a 7500 rpm otros 15 min. Este nuevo precipitado fue resuspendido y los parásitos se rompieron por presión y descompresión en un fraccionador celular Ribi Modelo RF-1. El HT obtenido se centrifugó a 1000 xg durante 15 min, y el precipitado fue sembrado en un gradiente de sacarosa discontinuo que se centrifugó a 90000 xg por 60 minutos. La FF se localiza en la capa superior del gradiente a una concentración de sacarosa de 1.58 M.

2.3 Preparación de ISCOMS de la fracción flagelar (FF-ISCOMS)

Los FF-ISCOMS fueron preparados por el método de dialisis (Lövgren & Morein, 1988). Como agente solubilizante de las proteínas de membrana se utilizó el detergente no iónico MEGA-10 (N-decanoil-N-metilglucamina). La FF disuelta en PBS se incubó durante 30 minutos en presencia de Mega-10 0.25% en un rotador de tubos y luego fue sembrada en un gradiente de sacarosa discontinuo (30% en el fondo, 10%-0.2 % MEGA-10 en la parte superior). Se centrifugó durante 2 horas a 4 °C a 25000 rpm. A la fracción correspondiente a la muestra se le agregó el glicósido Quil A a una concentración final de 0.1 %, y una solución de lípidos conteniendo 1:1 fosfatidil colina y colesterol al 10 %. Esta suspensión se sonicó durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se dializó contra PBS durante 24 horas a temperatura ambiente y luego por 24 horas más a 4 °C. La muestra se sembró después en un colchón de sacarosa 10 % y se centrifugó a 100000 x g en un rotor Kontron TST-41.14 durante 18 horas. El precipitado se resuspendió en PBS y se guardó a -20 °C hasta su uso.

2.4 Microscopía Electrónica

Para el análisis por microscopía electrónica, las muestras se microdializaron contra buffer fosfato 0.1 M pH 7.2 y se trataron con molibdato de amonio 2 % pH 7.0. Las muestras se colocaron sobre grillas y se fotografiaron con un microscopio electrónico Philips 300 a un voltaje de aceleración de 60 kV.

2.5 Geles de poliacrilamida con SDS

El análisis de las proteínas se realizó mediante geles de poliacrilamida al 11 o 12 % con SDS según el método de Laemli, 1970. Para la polimerización se usó TEMED y persulfato de amonio (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Los geles se corrieron a 180 V por 45 min.

2.5.1 Geles de la FF y los FF-ISCOMS

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata según el método descrito por Tunon & Johansson (1984). Los geles se lavaron con metanol 20 %, ácido acético 10 % y luego se fijaron con glutardialdehído. La tinción se realizó con una solución de plata amoniaca y se lavó con etanol al 10 %. El desarrollo de color se realizó incubando en formaldehído 0.1 % y la reacción se frenó con etanolamina.

2.5.2 Geles de las subfracciones de la FF

Los geles donde se corrieron el Ag 123 y FT fueron teñidos por 1 h con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma, St. Louis, MO. USA) al 0.1 % en metanol 20 %, ácido acético 10 %.

2.6 Western blotting

Las proteínas separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida 12% fueron transferidas a nitrocelulosa según el método de Towbin *et al.* (1979). Después de bloquear las membranas

con leche descremada 5 %, se incubaron con los correspondientes anticuerpos por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween 0.05 % y se incubaron con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Dakopatts, A/S, Dinamarca). Las bandas proteicas se revelaron con cloruro de p-nitroblue tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4cloro-3-indol fosfato p-toluideno (BCIP) (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). La reacción se frenó con agua destilada.

2.6.1 Western blotting de la FF y los FF-ISCOMS

En este caso proteínas de la FF y de los FF-ISCOMS se corrieron en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear las membranas se incubaron con sueros anti-FF, anti-FF-ISCOMS y de animales crónicamente infectados.

2.6.2 Western blotting con sueros anti-FF/matrix y anti-FT/matrix

Proteínas de homogenato total de epimastigotes separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida 12 % se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear, las membranas se incubaron con los sueros anti-FF + matrix y anti-FT + matrix durante 1 hora a temperatura ambiente.

2.7 Preparación de antisueros

Los antisueros se obtuvieron inmunizando repetidamente a ratones BALB/c de 21 días.

2.7.1 Antisueros anti-FF y anti-FF-ISCOMS

Para la preparación de los antisueros anti-FF y anti-FF-ISCOMS los animales se inmunizaron con 2 dosis de 4 μ g de FF o FF-ISCOMS, con un intervalo de 4 semanas.

2.7.2 Antisueros anti-FF/matrix y anti-FT/matrix

Para la obtención de los antisueros anti-FF/matrix y anti-FT/matrix los animales se inmunizaron con 3 dosis de 10 μ g de FF o FT, usando 10 μ g/dosis de matrix de ISCOM (Iscomune-M40, Iscotec AB, Luleå, Suecia) como adyuvante. Las inmunizaciones fueron administradas con intervalos de 5 y 4 semanas.

2.8 Enzimoinmunoensayo (ELISA)

Los ELISA se realizaron según el método de Voller (1975). Se usaron placas de 96 pocillos que se cubrieron con los correspondientes antígenos incubando 16 horas en buffer Carbonato pH 9.6 a 4 °C. Las placas se bloquearon con leche descremada 5 % en PBS durante 1 hora a 37 °C. Después de realizar 3 lavados con PBS-Tween 0.05 % se agregaron 100 μ l de distintas diluciones de los antisueros y/o anticuerpos monoclonales y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05 % y se incubaron con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a la enzima peroxidasa (Dakopatts, A/S, Dinamarca). El ensayo fue revelado mediante el desarrollo de una reacción colorimétrica.

2.8.1 ELISA con sueros anti-FF y anti-FF-ISCOMS

En este caso las placas se cubrieron con FF (20 µg/ml). Después de bloquear y lavar, se agregaron 100 µl de distintas diluciones de los antisueros anti-FF y anti-FF-ISCOMS y se incubó durante 1 hora a 37 °C, y por una hora más con el anticuerpos secundario conjugado a peroxidasa. Para la detección colorimétrica se uso dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD) 0.05% (Sigma, St. Louis, MO. USA), 0.1% H₂O₂ en buffer Citrato pH 5. Las placas se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA después de frenar la reacción con H₂SO₄ 1N.

2.8.2 ELISA para el análisis de los sobrenadantes de hibridoma

El antígeno pegado a la placa fue homogenato total del parásito (10 µg/ml). Después del bloqueo, se agregaron 100 µl de distintas diluciones de los sobrenadantes de hibridoma y se incubó durante 1 hora a 37 °C, y por una hora más con el anticuerpos secundario conjugado a peroxidasa. Para la detección colorimétrica se usó una solución tetrametil-benzidina (TMB) y H₂O₂. La placas se leyeron a 450 nm en un lector de placas después de frenar la reacción con H₂SO₄ 1 N.

2.8.3 ELISA para la evaluación de títulos de anticuerpos anti-FF/matrix y anti-FT/matrix

En este caso las placas de se cubrieron con FF (5 µg/ml). Después de bloquear y lavar, se agregaron 100 µl de distintas diluciones de los antisueros anti-FF + matrix o anti-FT + matrix y se

incubó durante 1 hora a 37 °C. La reacción colorimétrica se determinó como se describió en 2.8.2.

2.8.4 ELISA para la detección de isotipos

Para la detección de isotipos las placas se cubrieron con FF a una concentración de 5 µg/ml. Después de bloquear las placas fueron incubadas con 100 µl de distintas diluciones de los sueros anti-FF + matrix o anti-FT + matrix y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Los distintos isotipos fueron determinados incubando por 1 hora a 37 °C con anticuerpos de conejo anti-ratón contra las subclases IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA, IgE, IgM (Dakopatts A/S, Glostrup, Dinamarca). Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05 % y se incubaron con un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a la enzima peroxidasa (Dakopatts A/S, Glostrup, Dinamarca). La reacción colorimétrica se determinó como se describió en 2.8.2.

2.9 Ensayos de linfoproliferación

Suspensiones de esplenocitos de ratones BALB/c se sembraron en medio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK), L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, gentamicina, 50 µg/ml, suero fetal bovino 5 % (SVA, Uppsala, Suecia) y se distribuyeron en placas de 96 pocillos con fondo cóncavo a una densidad de 2×10^6 células/ml (0.2 ml/well). Las células fueron estimuladas con los correspondientes antígenos o mitógenos durante 4 días. Células cultivadas con medio solo fueron usadas como control negativo. Se adicionó [³H-metil]-timidina (2 µCi/well, 5 Ci/mmol, Amersham, UK) en cada pocillo 24 horas antes de cada cosecha. Las células se cosecharon en papel de filtro de fibra

de vidrio utilizando un cosechador y la cantidad de radiactividad incorporada se cuantificó en un contador beta de placas (LKB Wallac, Turku, Finlandia).

2.9.1 Ensayo de linfoproliferación en esplenocitos de ratones inmunizados con FF y FF-ISCOMS

En esta serie de experimentos se usaron suspensiones de esplenocitos provenientes de ratones BALB/c inmunizados con 2 dosis de 4 μ g cada una de FF o FF-ISCOMS. Las células fueron estimuladas con FF (10 μ g/ml) durante 4 días.

2.9.2 Ensayos de linfoproliferación con las subfracciones de la FF

En este caso, se usaron esplenocitos provenientes de ratones BALB/c normales o inmunizados FF-ISCOMS (2 dosis de 4 μ g cada una). Las células fueron estimuladas de 1 a 4 días con las distintas subfracciones de la fracción flagelar (10 μ g/ml) o con Concanavalina A (Con A) en una concentración final de 5 μ g/ml.

2.9.3 Neutralización de la actividad supresiva del Ag 123 con un anticuerpo anti-TGF- β

Para determinar si el TGF- β estaba involucrado en el efecto supresivo mediado por el Ag 123, esplenocitos de ratones BALB/c fueron estimulados durante 4 días con Con A y el Ag 123 en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- β (20 μ g/ml) (Genzyme, Cambridge, MA, USA). La linfoproliferación fue medida como se describió anteriormente.

2.9.4 Ensayo de linfoproliferación en esplenocitos de ratones inmunizados con FF/matrix y FT/matrix

Se utilizaron suspensiones de esplenocitos provenientes de ratones BALB/c inmunizados con FF y matrix o FT y matrix (2 dosis de 10 µg cada una). Las células fueron estimuladas durante 4 días con 10 µg/ml de FF o FT.

2.10 Obtención y estimulación de macrófagos peritoneales murinos

Ratones BALB/c fueron inyectados en la cavidad peritoneal con 5 ml de PBS. Las células peritoneales, suspendidas en el buffer fueron recogidas aspirando en la cavidad peritoneal con una pipeta Pasteur. Las células se lavaron 2 veces y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK), L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, gentamicina, 50 µg/ml, suero fetal bovino 5 % (SVA, Uppsala, Suecia) a una densidad de 1×10^6 células/ml en tubos de criopreservación de 1 ml. Las células fueron estimuladas con 10 µg/ml de FF o FT durante 24 horas. Células cultivadas con medio solo fueron usadas como control negativo.

2.11 ELISA de captura para la detección de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ, IL-1 e IL-6

Se usaron los siguientes pares de anticuerpos: JES6-1A12 para captura y JES6-5HA para detección de IL-2 (PharMingen); 11B11 (ATCC HB188) para captura y BVD6-24G2 (PharMingen) para detección de IL-4; 8141D para captura y 18152D para detección de IL-10 (PharMingen); R4-6A2 (ATCC H B 170) para captura y XmG1.2

(Pharmigen) para detección de IFN- γ ; 1837-01 para captura y IP-110 para detección de IL-1 (Genzyme) y 1871-D para captura y 18082 D (Pharmingen) para detección de IL-6. Todos los anticuerpos usados para detección fueron biotinilados. Para el ensayo, se usaron placas EIA/RIA (Costar, Cambridge, MA) a las que se le pegó el anticuerpo de captura, incubando 16 horas a 4 °C. El pegado de los anticuerpos anti-IL-2, IL-4, IL-10, IL-1 e IL-6 se realizó en buffer Carbonato pH 9.6 y para el de IFN- γ se uso PBS pH 7.4. Las placas se bloquearon incubando 1 hora a 37 °C con solución de bloqueo (leche descremada 5 % para IL-2, IL-4, IL-1 e IL-6 y seroalbumina bovina (BSA) 1 % para IL-10 y IFN- γ , en ambos casos diluídas en PBS). Los sobrenadantes de células provenientes de ensayos de proliferación o de macrófagos estimulados *in vitro* fueron incubados por duplicado o triplicado durante 16 horas a 4 °C en agitación suave. Después de lavar con PBS-Tween 0.05 %, las placas se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente con sus respectivos anticuerpos biotinilados. Seguidamente se incubó con un conjugado estreptoavidina-peroxidasa (Dakopatts A/S, Glostrup, Dinamarca). La reacción colorimétrica se detectó agregando tetrametil-benzidina (TMB) y H₂O₂. La placas se leyeron a 450 nm en un lector de placas. La concentración de citoquinas en las muestras se calculó usando citoquinas murinas recombinantes (Genzyme, Cambridge, MA, USA) para la preparación de las correspondientes curvas estándar.

2.12 ELISA de captura para la detección de TGF- β

TGF- β se cuantificó mediante un ELISA de captura. El anticuerpo monoclonal 1835-01 (Genzyme, MA, USA) que reacciona con TGF- β _{1,2} and β ₃ se utilizó para la captura y el anticuerpo BDA

47 (British Biotechnology, Oxon, UK) biotinilado, pan-específico para TGF- β , fue usado para la detección. Para el ensayo, se usaron placas EIA/RIA (Costar, Cambridge, MA) a las que se le pegó el anticuerpo de captura, incubando 16 horas a 4 °C en NaH₂PO₄ 0.2 M pH 4.5, conteniendo NaN₃ 0.005 %. Las placas se bloquearon incubando 8 horas a temperatura ambiente con solución de bloqueo (sorbitol 6 %, NaCl 0.9 %, BSA 0.1 %, CaCl₂ 0.1 mM, EDTA 4 mM, NaN₃ 0.005 %, NaH₂PO₄ 50 mM pH 4.8). El TGF- β fue activado en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados *in vitro*, o en sueros de animales tratados incubando con TCA 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron luego neutralizadas con la adición de NaOH 1 M. Las muestras se incubaron por duplicado, durante 16 horas a 4 °C en agitación suave. Después de lavar con solución de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7.8, NaCl 0.09 %, Tween 20 0.05 %), las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo biotinilado. Seguidamente se incubó con un conjugado estreptoavidina-europio por 1 hora a temperatura ambiente (Wallac Oy, Turku, Finlandia). Las placas se lavaron 5 veces con solución de lavado y finalmente se incubaron con solución amplificadora (DELFLIA[®] Enhancement solution, Wallac Oy, Turku, Finland) por 20 min en agitación. Los complejos inmunes se detectaron por la emisión de fluorescencia en un fluorómetro (1234 DELFLIA Research Fluorometer, Wallac Oy, Turku, Finlandia). La concentración de TGF- β en las muestras se calculó usando TGF- β de plaquetas porcinas (British Biotechnology, Oxon, UK) para la preparación de la curva estándar. Este ensayo detecta TGF- β activado y no reacciona con el factor sin activar

2.13 Ensayos de hipersensibilidad tardía

Ratones de la cepa BALB/c inmunizados con 3 dosis de 4 µg de FF o FF-ISCOMS o con 2 dosis de 10 µg de FF o FT fueron inoculados por vía intradérmica con 20 µg de homogenato total del parásito. Se midió con un calibre el diámetro de la almohadilla plantal de la pata derecha de los ratones, previamente a la inoculación y 24 hs después de la misma. Se calculó el índice de induración como el cociente entre los diámetros después y antes de la inoculación para cada ratón.

2.15 Producción de anticuerpos monoclonales

Ratones BALB/c fueron inyectados por vía subcutánea (s.c.) con 2 dosis (4 µg proteína cada una) separadas por un intervalo de 4 semanas de FF-ISCOMS. Cinco días después de la segunda dosis, los animales se sacrificaron, se removieron los bazo y los esplenocitos fueron fusionados a células de mieloma SP2. Para identificar los clones positivos, los sobrenadantes de hibridoma se analizaron mediante un ELISA contra homogenato total de parásito. Los hibridomas positivos fueron clonados por el método de dilución límite.

2.16 Purificación del anticuerpo monoclonal TC2C123

La purificación del anticuerpo se realizó usando una columna de 3-(2-piridilsufato)-2-hidroxiopropil agarosa (Pys-gel). Cien mililitros de sobrenadante de hibridoma fueron liofilizados y resuspendidos en un volumen de K₂SO₄ 0.5 M, Tris 0.1 M pH 7.5 (Buffer de pegado). La solución se aplicó a la columna y se dejó reaccionar por 30 min. La

columna se lavó con 5 volúmenes de buffer de pegado y el material retenido fue eluido con buffer Tris 0.1 M pH 7.5.

2.17 Acople del anticuerpo TC2C123 a Sepharosa activada con CnBr y purificación de antígenos por afinidad

Cincuenta mg del anticuerpo monoclonal TC2C123 se dializaron 24 horas a 4 °C contra PBS y se diluyeron en 1 volumen de NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 0.5 M pH 8.3 (buffer de acople). El anticuerpo fue acoplado a Sepharosa 4B activada con CnBr según el protocolo sugerido por el fabricante (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Veinte mg de homogenato total del parásito o 5 mg de fracción flagelar se diluyeron en TBS, 0.5 % Mega-10. La suspensión se incubó por 30 min en rotación a temperatura ambiente. La muestra se aplicó a la columna y se dejó en rotación por 16 horas a 4 °C. La columna se lavó con TBS para recuperar el material no retenido hasta que la absorbancia a 280 nm fue igual a 0. El material específico se eluyó con buffer Glicina-HCl, pH 2.4.

2.18 Marcación metabólica con [³⁵S]-Metionina

Epimastigotes de la cepa Tulahuén se lavaron 2 veces con medio MEM libre de metionina (Gibco, Paisley, UK). Los parásitos se resuspendieron en el mismo medio a una concentración de 2.5×10^7 parásitos/ml y se agregó [³⁵S]-Metionina (100 µCi/ml) (1000 Ci/mmol, Amersham). La marcación se realizó durante 2 horas a 37°C, 5 % de CO₂, y atmósfera humidificada. Al finalizar la incubación los parásitos se lavaron dos veces con medio FDEMEM (Gibco, Paisley, UK) frío y se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min. El

pellet se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis (Triton-X 0.5 %, deoxicolato 0.5 %, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM, Trasilol 0.1 %). La muestra se incubó por 30 min a 4 °C y la ruptura de los parásitos se completó con 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento.

2.19 Iodinación del homogenato total de parásito

El homogenato total de epimastigotes de la cepa Tulahuén se marcó con [¹²⁵I] usando Iodo-beads (Pierce, Illinois, USA) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

2.20 Inmunoprecipitación de lisados de parásito marcados radiactivamente

Lisados de epimastigotes de la cepa Tulahuén metabólicamente marcados con [³⁵S]-Metionina, o iodinados con [¹²⁵I] se alicuotaron en volúmenes de 500 µl y se preadsorbieron con 20 µl de Proteína A-Sepharosa, incubando durante 30 min en rotación a 4 °C. Al finalizar la incubación se centrifugó por 5 min a 5000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Las muestras fueron incubadas luego con 50 µl de Sepharosa 4B acoplada al anticuerpo monoclonal TC2C123 por 16 horas a 4 °C. Los complejos inmunes fueron después lavados 3 veces con PBS-Mega-10, 0.2 %, EDTA 5 mM, Trasilol 0.1 %, PMSF 1 mM, y 1 vez con Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M. Finalmente las muestras se lavaron 1 vez con PBS y el precipitado se resuspendió en buffer de muestra para ser sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida 12 %. Después de la corrida el gel se transfirió a

nitrocelulosa, y el filtro se expuso durante 1 semana a una película de rayos X R (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan).

2. 21 Biotinilación de la FF y del FT

Para la biotinilación de la FF y del FT, 1 mg/ml de proteínas fue diluído en NaHCO₃ 0.2 M pH 8.8 conteniendo NaCl 0.15 M. La biotina-NHS (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) se adicionó a una concentración final de 0.1 mg/ml y la muestra fue incubada por 15 min en agitación. La reacción de biotinilación se frenó agregando NH₄Cl 0.1 M y las muestras fueron dializadas contra PBS.

2.22 Inmunoprecipitación de la FF y del FT biotinilados

Cincuenta µg de FF o FT biotinilados se disolvieron en 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, conteniendo NaCl 0.15 M, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM, Trasilol 0.1 %, Triton-X 0.5 % y deoxicolato 0.5 %) y se preadsorbieron con 20 µl de Sepharosa 4B, incubando durante 30 min en rotación a 4 °C. Al finalizar la incubación se centrifugó por 5 min a 2000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Las muestras fueron incubadas luego con 50 µl de Sepharosa 4B acoplada al anticuerpo monoclonal TC2C123 por 16 horas a 4 °C. Los complejos inmunes fueron después lavados 3 veces con buffer de lisis y 2 veces con Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, 0.5 % Mega-10. Por último, las muestras se lavaron 1 vez con PBS y el precipitado se resuspendió en buffer de muestra para ser sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida 12 %. Después de la corrida el gel se transfirió a nitrocelulosa, y el filtro se bloqueó incubando 16

horas a 4 °C con leche descremada 5 % en PBS. La membrana fue luego lavada durante 15 min con PBS, y se incubó por una hora con un conjugado estreptoavidina-peroxidasa (Dakopatts A/S, Glostrup, Dinamarca). La aparición de bandas fue detectada incubando por 1 min con luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4 talazina) 1.25 mM y ácido p-cumárico 0.68 mM en presencia de peróxido de hidrógeno al 3 % y exponiendo el filtro por 15 seg a una película de rayos X R (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan).

2.23 Digestión de proteínas y purificación de péptidos

La digestión de proteínas se realizó según el método de Hellman *et al.* (1995). Después de la separación electroforética de las proteínas en geles de poliacrilamida, los geles fueron teñidos con Coomassie Blue, desteñidos y las bandas a digerir fueron escindidas del gel y transferidas a tubos Eppendorf de 1.5 ml. Las muestras se lavaron 2 veces con bicarbonato de amonio 0.2 M (AMBIC), acetonitrilo 50 % por 30 minutos a 30 °C. El gel fue después completamente secado con nitrógeno líquido y rehidratado con 5 µl de AMBIC 0.2 M, Tween-20 0.02 %. Inmediatamente se agregaron 0.5 µg de tripsina (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). El gel se rehidrató agregando repetidamente alícuotas de 5 µl de AMBIC 0.2 M. La digestión se realizó incubando 16 horas a 30 °C. La reacción se frenó agregando ácido trifluoracético (TFA) 10 %. Los péptidos resultantes fueron extraídos con TFA 0.1 %, acetonitrilo 60 %.

2.24 Purificación de péptidos

Los fragmentos provenientes de la digestión en gel con tripsina fueron aislados mediante su separación por cromatografía líquida en fase reversa. Se usó una columna mRPC C2/C18 SC 2.1/10 de calibre angosto, operada en un sistema SMART® (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las muestras fueron eluidas con un gradiente de 0 a 40 % acetonitrilo en 0.065 a 0.05 % TFA a un flujo de 100 ml/min.

2.25 Secuenciación automática de aminoácidos

Los péptidos obtenidos por digestión trípica en gel fueron sometidos a degradación de Edman en un secuenciador Modelo 470 A, equipado con un analizador automático de aminoácidos, modelo 120 A (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los instrumentos fueron manejados según las instrucciones sugeridas por el fabricante.

2.26 Inmunoprecipitación del homogenato total con anti-AFP humano

Cien µg de homogenato total de epimastigotes se disolvieron en 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, conteniendo NaCl 0.15 M, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM, Trasilol 0.1 %, Triton-X 0.5 % y deoxicolato 0.5 %) y se preadsorbieron con 20 µl de Sepharosa 4B, incubando durante 30 min en rotación a 4 °C. Al finalizar la incubación se centrifugó por 5 min a 2000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Las muestras fueron incubadas luego con anticuerpo policlonal de conejo anti-AFP humano (Dakopatts A/S, Glostrup, Dinamarca) por 16 horas a 4 °C. Un anticuerpo irrelevante de conejo

dirigido contra una fosfatasa humana y Sepharosa 4B sola fueron usados como controles negativos. Para precipitar las proteínas específicas reconocidas por el anti-AFP se incubó por 1 hora con Proteína A-Sepharosa. Los complejos inmunes fueron después lavados 3 veces con buffer de lisis y 2 veces con Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, 0.5 % Mega-10. Por último, las muestras se lavaron 1 vez con PBS y el precipitado se resuspendió en buffer de muestra para ser sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida 12 %. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, según el método de Towbin y col. (1979). La membrana se bloqueó con seroalbúmina bovina al 5 % en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar por 15 min con PBS, la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal TC2C123 biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue luego lavada 3 veces con PBS-Tween 0.05 % y se incubó con un conjugado estreptoavidina-peroxidasa (Dakopatts A/S, Glostrup, Dinamarca). La aparición de bandas fue detectada incubando por 1 min con luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4 talazina) 1.25 mM y ácido p-cumárico 0.68 mM en presencia de peróxido de hidrógeno al 3 % y exponiendo el filtro por 15 seg a una película de rayos X R (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan).

2.27 Obtención de tripomastigotes metacíclicos

Los tripomastigotes metacíclicos fueron obtenidos de macerados de ampolla rectal de *Triatoma infestans* alimentadas 30 días antes con sangre de ratones infectados con la cepa Tulahuén del *Trypanosoma cruzi*.

2.28 Experimentos de inmunoprotección en ratones inmunizados con FF y FF-ISCOMS

Ratones de 21 días de la cepa BALB/c fueron inmunizados por vía subcutánea (s.c.) con 3 dosis de 4 μg de FF o FF-ISCOMS separadas por intervalos de 5 semanas o bien con 3 dosis de 10 μg de FF o FT, usando 10 μg matrix de ISCOMS (Iscomune-M40, Iscotec AB, Luleå, Suecia) como adyuvante, separadas por intervalos de 5 y 4 semanas. Los animales inmunizados y sus respectivos controles no inmunizados se desafiaron 30 días después de la última dosis con 1000 tripomastigotes metacíclicos por vía intraperitoneal. La parasitemia se determinó cada tres días por observación directa al microscopio óptico según el método de Brener (1962) hasta el día 40 post-infección.

2.29 Análisis estadístico

Para la evaluación de los datos se usó un test-*t* de Student pareado. La correlación entre la respuesta proliferativa a FF y la producción de IL-2 se evaluó calculando el índice de correlación (r^2).

Resultados

3. RESULTADOS

3.1 Primera parte: Preparación y caracterización de ISCOMS con la fracción flagelar de *Trypanosoma cruzi*

Como se ha descrito en la sección INTRODUCCIÓN, inmunizaciones con la fracción flagelar de epimatigotes de *T. cruzi*, adyuvada con *Bordetella pertussis*, inducen protección en animales de experimentación, evidenciada en ausencia de mortalidad, niveles mas bajos de parasitemia y disminución de la histopatología después de un desafío parasitario (Ruiz *et al.*, 1986). Sin embargo, las dosis requeridas para alcanzar esta repuesta son sumamente elevadas.

Un método eficaz para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos, lo constituye su presentación en forma multimérica. El ISCOM (Morein *et al.*, 1984) es una formulación que reúne esta característica con la presencia de un poderoso adyuvante, el Quil A, en una misma partícula. Los ISCOMS no sólo aumentan las respuestas inmunológicas sino que también presentan cierto grado de inmunomodulación, estimulando la producción de IL-2 e IFN- γ y respuesta citotóxica. Estos procesos son de suma importancia en la resistencia al *T. cruzi* (Choromansky & Kuhn, 1985, Torrico *et al.*, 1991), por lo cual una vacuna diseñada para proteger contra la infección con el parásito debería ser capaz de inducir la producción de estos mecanismos.

En esta sección se describen la preparación y la caracterización morfológica e inmunologica de ISCOMS conteniendo proteínas de la fracción flagelar de epimastigotes de *T. cruzi* .

3.1.1 Preparación y caracterización de ISCOMS de la fracción flagelar (FF-ISCOMS) de epimastigotes de *T. cruzi*

Los FF-ISCOMS fueron preparados por la técnica de diálisis según se describe en Materiales y Métodos. Su análisis por microcopía electrónica mostró una población homogénea de ISCOMS, caracterizados por su típica estructura tipo celda (Fig. 1). El diámetro de los FF-ISCOMS fue de alrededor de 35 nm.

El análisis en geles de poliacrilamida indicó que la mayoría de las proteínas de la FF están presentes en los FF-ISCOMS. La figura 2 muestra que los FF-ISCOMS están compuestos por varias bandas entre 70 y 24 kDa, con 2 bandas principales de 70 y 50 kDa. En Western blot, antisueros anti-FF reconocieron el mismo patrón de bandas sobre la FF y sobre los FF-ISCOMS. Estos antisueros reconocen 4 bandas de 180, 70, 60-65 y 50-54 kDa (Fig. 3 calles **a** y **b**). Sueros de ratones inmunizados con FF-ISCOMS reconocieron este mismo patrón de bandas tanto sobre la FF como sobre los FF-ISCOMS (Fig. 3 calles **c** y **d**). Sueros de animales infectados crónicamente con *T. cruzi* detectaron un mayor número de bandas en Western blot que los sueros de animales inmunizados. Estos antisueros reconocieron tanto en la FF como en los FF-ISCOMS 10 bandas entre 200 y 14 kDa (Fig. 3 calles **e** y **f**).

3.1.2 Respuesta de anticuerpos inducida por FF-ISCOMS

La respuesta de anticuerpos fue medida por la técnica de ELISA en sueros de ratones BALB/c inmunizados vía s.c., 2 veces con 4 µg de FF o FF-ISCOMS. Sueros de ratones no inmunes fueron usados como control negativo. Después de la primera dosis, no se observaron

diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos inducidos por la FF o los FF-ISCOMS (Fig. 4A). Sin embargo, después de la segunda inmunización, los niveles de anticuerpos inducidos por los FF-ISCOMS fueron significativamente mayores a los evocados por la FF sola (Fig. 4 B)

3.1.3 Respuesta inmune mediada por células inducida por los FF-ISCOMS

La respuesta inmune celular fue evaluada midiendo la linfoproliferación mediada por antígenos, la secreción de citoquinas y la respuesta de hipersensibilidad tardía. Cuando se midieron la respuesta linfoproliferativa y la producción de citoquinas, ratones BALB/c fueron inyectados (s.c.) 2 veces con 4 μ g de FF o FF-ISCOMS. Sesenta días después de la segunda dosis los animales se sacrificaron, los bazos se removieron asépticamente y los esplenocitos fueron estimulados con FF (10 μ g/ml) durante 4 días. En experimentos preliminares se demostró que esta concentración de proteínas es suficiente para estimular proliferación celular y secreción de citoquinas. La respuesta proliferativa de esplenocitos de ratones inmunizados con FF-ISCOMS fue significativamente mayor a la observada en aquellos provenientes de animales inyectados con FF sola (Fig. 5). Los esplenocitos de ratones inmunizados con FF-ISCOMS produjeron aproximadamente el doble de IL-2 que aquellos de animales inmunizados con FF (Fig. 6). En contraste, los niveles de IL-10 en sobrenadantes de células de animales inyectados con FF-ISCOMS fueron significativamente menores que los de ratones inmunizados con FF (Fig. 7). Por otro lado, ni IL-4 ni IFN- γ pudieron ser detectados en estos sobrenadantes celulares a ninguno de los

tiempos ensayados (24, 48, 72 y 96 horas). Los sobrenadantes de células cultivadas con medio solamente no presentaron niveles detectables de ninguna de estas citoquinas. Los niveles de IL-2 inducidos por células de animales inmunizados con FF mostraron una alta correlación con la respuesta proliferativa a FF durante los 4 días de estimulación ($r^2 = 0.976$) (Fig. 6 C). Por el contrario, en esplenocitos de ratones inmunizados con FF-ISCOMS, se observó un incremento inicial de la producción de IL-2 que fue luego seguido por un aumento de la respuesta proliferativa ($r^2 = 0.704$).

La respuesta de hipersensibilidad tardía medida en ratones BALB/c inmunizados 3 veces (s.c.) con 4 μ g de FF-ISCOMS fue significativamente mayor que la respuesta inducida por animales inmunizados con las mismas dosis de FF sola o que la de los controles no inmunes a los 21 días después de la última inmunización (Fig. 8).

3.1.4 Niveles de parasitemia de animales inmunizados con FF-ISCOMS ante un desafío parasitario

Ratones BALB/c inoculados con 3 dosis de 4 μ g (vía s.c.), separadas por intervalos de 5 semanas, de FF o FF-ISCOMS fueron desafiados por vía intraperitoneal con 1000 tripomastigotes metacíclicos, 30 días después de la última dosis. Los animales inmunizados con FF-ISCOMS mostraron un retardo en la aparición de la parasitemia comparado con ratones inyectados con FF sola o los controles no inmunizados. Al día 40 post-infección 40 % de los animales inmunizados con ISCOMS o de los controles no inmunes sobrevivieron, mientras sólo el 10 % de los animales inoculados con FF permanecieron vivos (Tabla I).

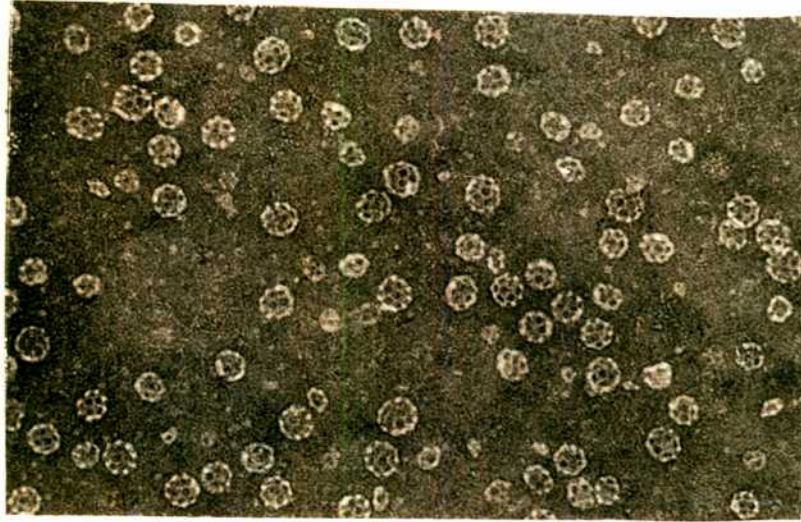


Figura 1: Microscopía electrónica de ISCOMS preparados con la fracción flagelar de epimastigotes de la cepa Tulahuén.

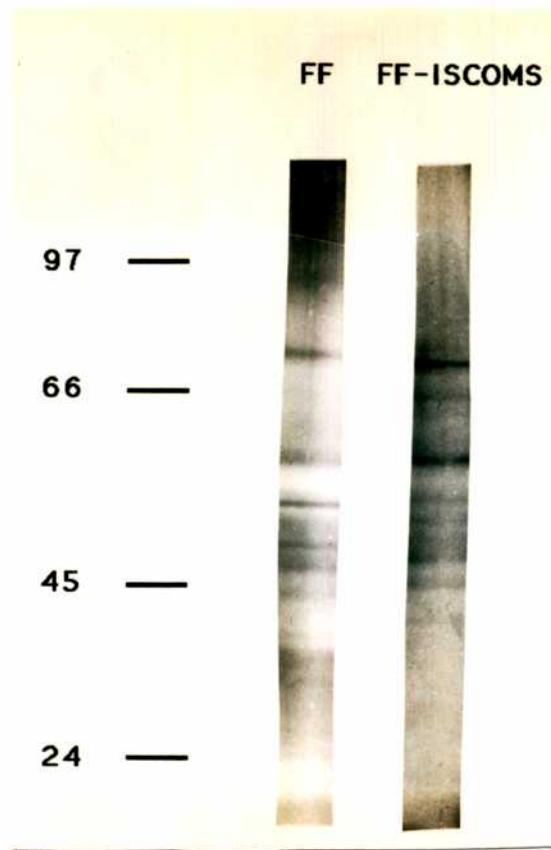


Figura 2: Análisis en gel de poliacrilamida de las proteínas presentes en la fracción flagelar (FF) y en los FF-ISCOMS. FF o FF-ISCOMS (10 μg de proteínas por calle) fueron corridos en un gel de acrilamida 11 % con SDS y teñidos con Tinción de Plata.

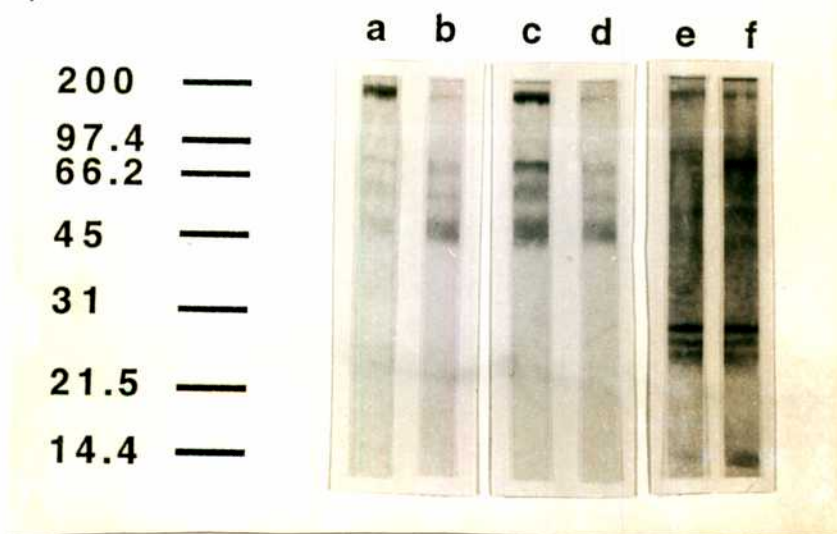
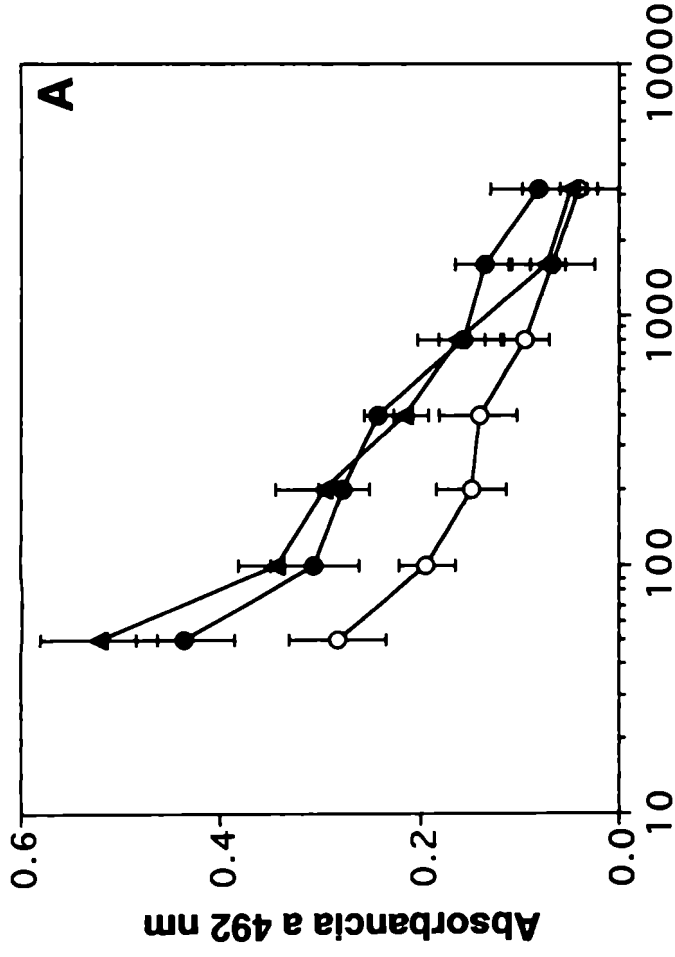
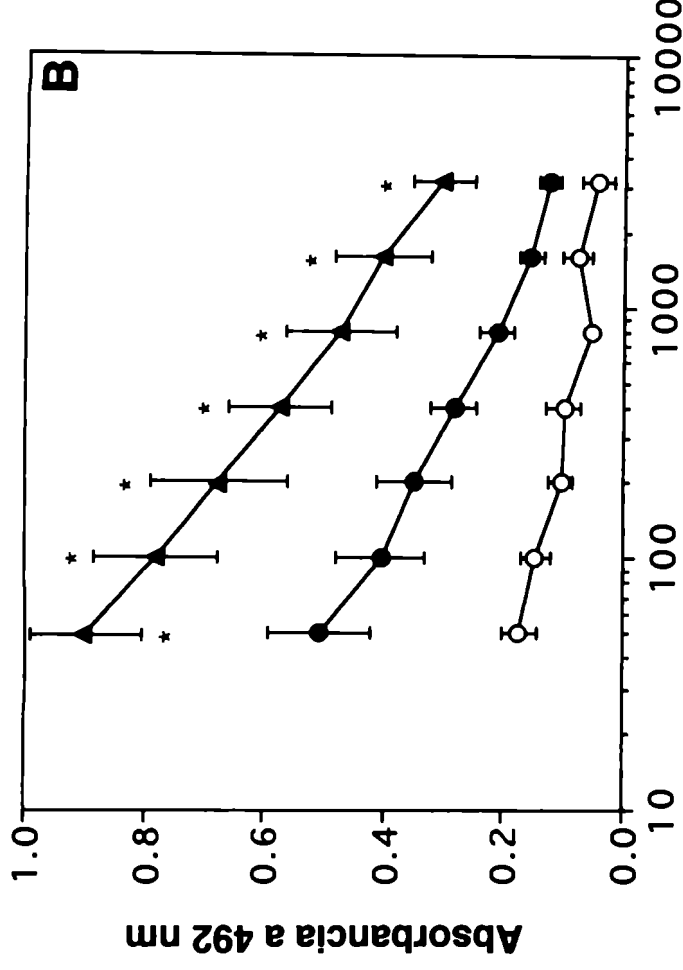


Figura 3: Análisis por Western blot de la FF y los FF-ISCOMS. Proteínas de la FF y de los FF-ISCOMS se corrieron en un gel de acrilamida 12 % con SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para Western blot. Las calles **a** (FF) y **b** (FF-ISCOMS) fueron incubadas en presencia de un antisuero anti-FF. Las calles **c** (FF) y **d** (FF-ISCOMS) se incubaron con un antisuero anti-FF-ISCOMS y las calles **e** (FF) y **f** (FF-ISCOMS) fueron detectadas con sueros de ratones crónicamente infectados con *T. cruzi*. Como anticuerpo secundario se usó un anti IgG de ratón conjugado a la enzima fosfatasa alcalina. Las bandas fueron reveladas con NBT y BCIP.



Recíproca de la dilución del suero



Recíproca de la dilución del suero

Figura 4: Niveles de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con 2 dosis (4 μ g) de FF (●) o FF-ISCOMS (▲) con un intervalo de 5 semanas. Los niveles de anticuerpos se determinaron 20 días después de la primer dosis (A) y 7 días después de la segunda (B) mediante un ELISA contra fracción flagelar. Sueros de ratones no inmunizados se usaron como control negativo (O). Cada punto representa el promedio de 4 sueros ensayados \pm DE, * $p < 0.05$, entre FF y FF-ISCOMS.

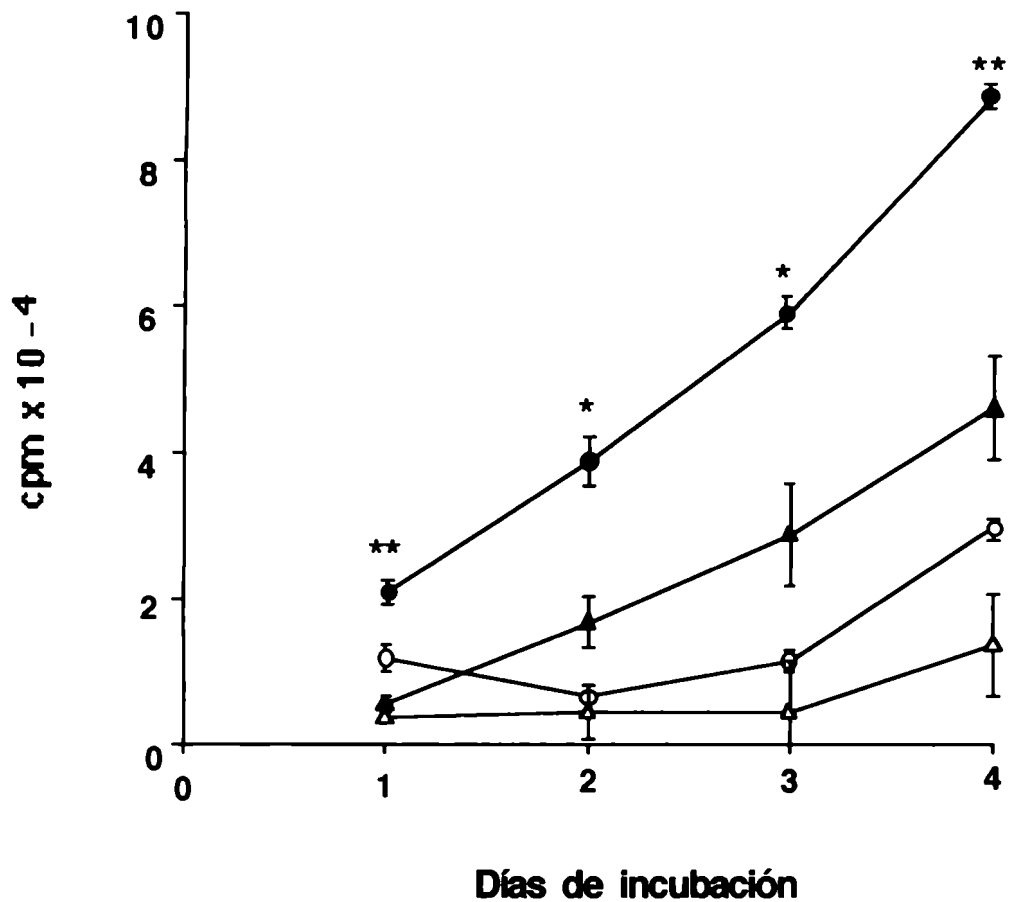


Figura 5: Respuesta proliferativa a la FF de esplenocitos de ratones inmunizados con 2 dosis de 4 µg de FF o FF-ISCOMS. Células de bazo de ratones BALB/c (n = 4) inmunizados con FF (▲) o FF-ISCOMS (●) fueron estimuladas durante 4 días con FF (10 µg/ml). Células de animales inmunizados con FF (△) y FF-ISCOMS (○) incubadas en medio de cultivo solo fueron usadas como control. Cada punto representa el promedio ± DE de 4 muestras ensayadas, * p < 0.005, ** p < 0.001 entre FF y FF-ISCOMS.

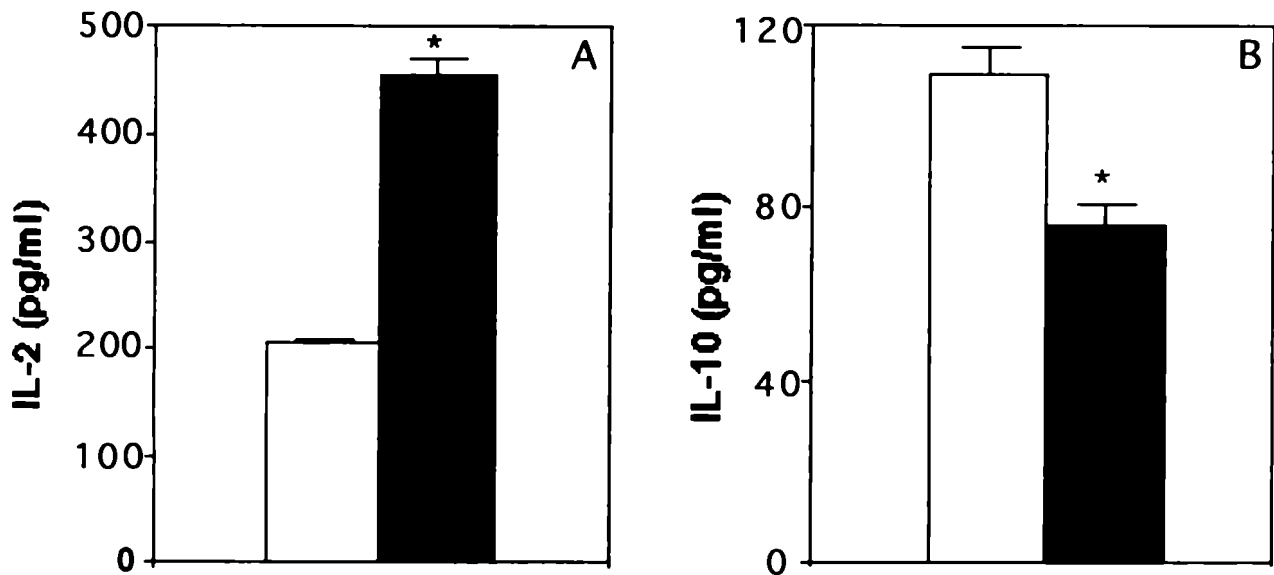


Figura 6: Niveles de IL-2 (**A**) y IL-10 (**B**) en sobrenadantes de esplenocitos de ratones ($n = 4$) inmunizados 2 veces con $4 \mu\text{g}$ de FF (□) o FF-ISCOMS (■) después de reestimulación *in vitro* con FF. Las células fueron estimuladas con $10 \mu\text{g/ml}$ de FF. Las citoquinas fueron determinadas en sobrenadantes celulares desde el día 1 a 4 de estimulación usando un ELISA de captura. Las barras representan los niveles máximos de citoquinas \pm DE detectados al día 2 para IL-2 y al día 4 para IL-10, * $p < 0.05$.

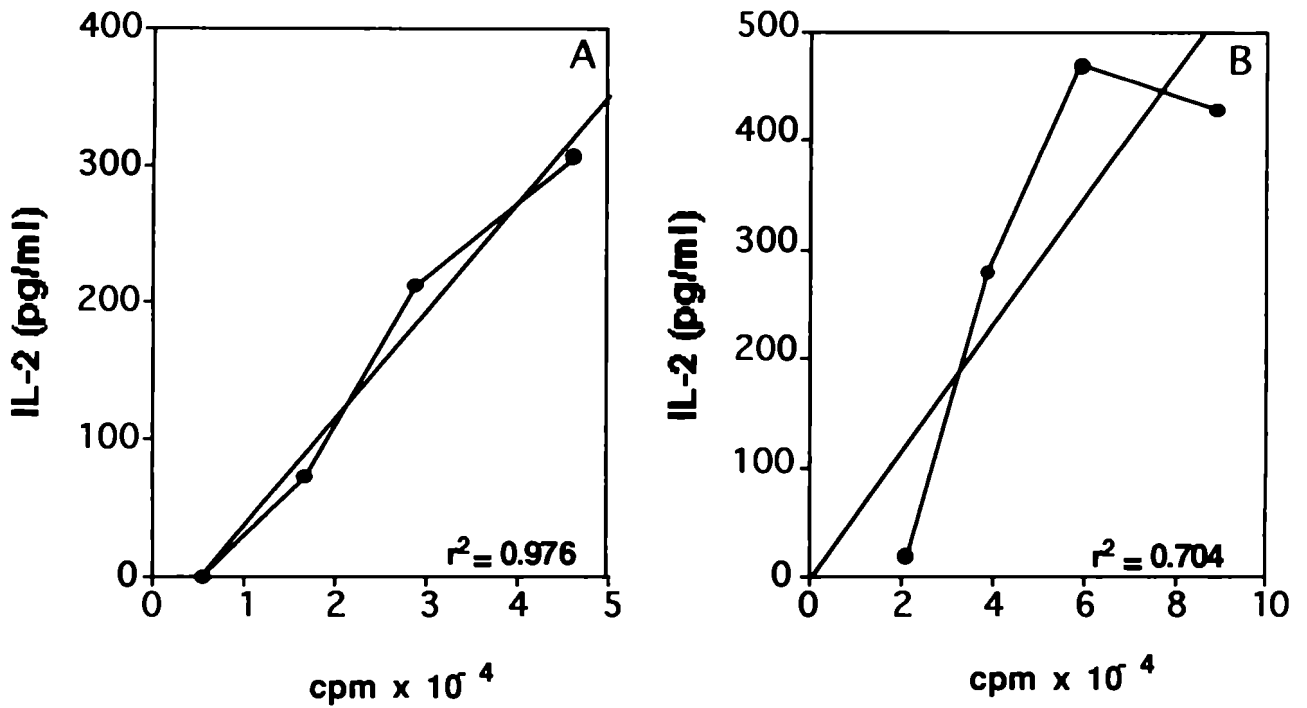


Figura 7: Correlación entre los niveles de IL-2 en sobrenadantes celulares (pg/ml) y la proliferación celular (cpm) de esplenocitos de ratones inmunizados con FF (A) y FF-ISCOMS (B) estimulados *in vitro* con FF durante 4 días.

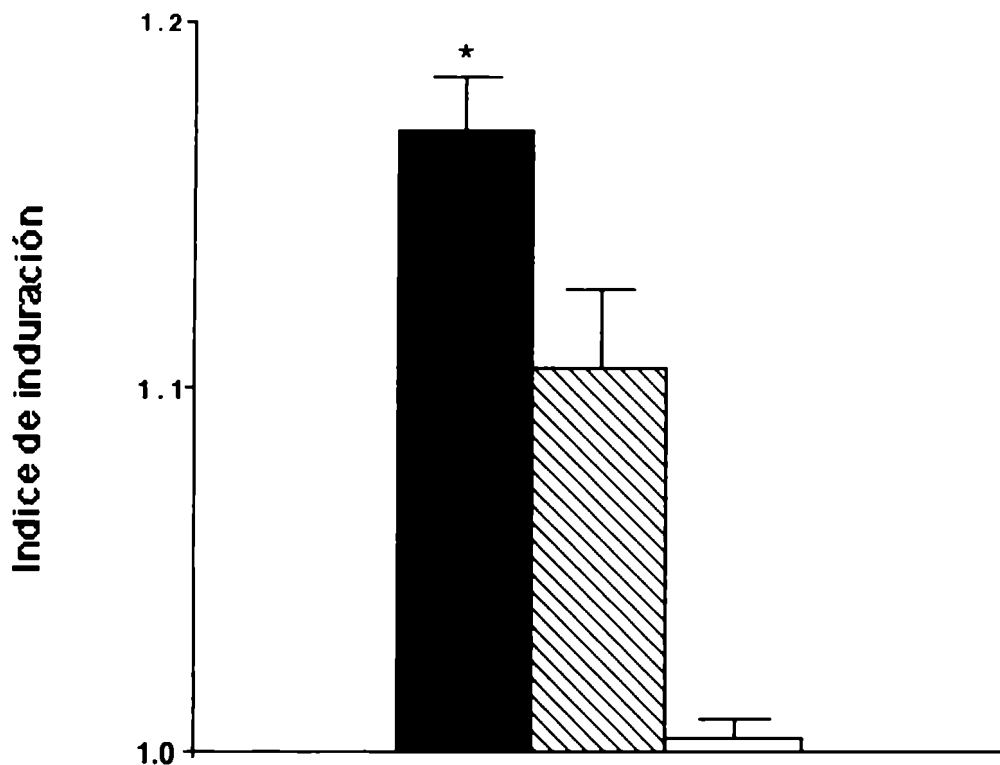


Figura 8: Test de hipersensibilidad tardía en ratones BALB/c inmunizados con FF (▨), FF-ISCOMS (■) y controles no inmunizados (□). Los animales recibieron 3 dosis (s.c.) de 4 µg de cada preparación, separadas por intervalos de 5 semanas. Las barras representan el promedio ± DE del índice de inducción de 6 ratones, * $p < 0.05$ entre FF y FF-ISCOMS.

3.2 Segunda Parte: Caracterización de un antígeno de la fracción flagelar de *Trypanosoma cruzi* que suprime la proliferación celular por un mecanismo dependiente de TGF- β

Cómo se ha descrito en la sección 3.1, ISCOMS preparados con la fracción flagelar de *T. cruzi* inducen una elevada respuesta inmune humoral y celular, que sin embargo sólo es capaz de conferir una limitada protección, evidenciada en un retardo de la aparición de la parasitemia y de la mortalidad en los ratones BALB/c. Dado que los FF-ISCOMS presentan una composición antigénica compleja es razonable postular que no todas las proteínas incluidas en los complejos están involucradas en la inducción de protección contra el parásito y que en nuestro modelo experimental, las dosis de ISCOMS administradas contendrían una baja proporción de aquellos antígenos responsables de montar una respuesta inmune protectora. Además, el hecho que los niveles de supervivencia de ratones inmunizados con la FF en ausencia de sistemas adyuvantes sea aún menor que el de los controles no inmunizados, sugiere la presencia de componentes en la FF con efectos perjudiciales para el desarrollo de una adecuada respuesta protectora. De hecho, la fase aguda de la enfermedad de Chagas está acompañada por un estado de inmunosupresión, presumiblemente involucrado en la facilitación de la diseminación del parásito en el mamífero huésped.

Hasta el presente no ha sido claramente establecido cómo el parásito provoca la inducción de estas respuestas supresivas. El entendimiento de la naturaleza de estos fenómenos, así como también del tipo de inmunidad involucrada en la inducción de una respuesta protectora, deben ser tenidos en consideración para formular una vacuna efectiva contra el *T. cruzi*.

Con el objeto de caracterizar los componentes individuales de la fracción flagelar se prepararon anticuerpos monoclonales usando esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con FF-ISCOMS. En el presente capítulo se describen las propiedades inmunológicas de subfracciones de la fracción flagelar definidas por inmutafinidad a uno de los anticuerpos monoclonales obtenidos. Una de esas subfracciones es un potente activador de la respuesta inmune celular, mientras que la otra mostró actividad inmunosupresora *in vitro*, inhibiendo la proliferación celular a través de un mecanismo dependiente de TGF- β .

3.2.1 Subfracciones de la fracción flagelar definidas por un anticuerpo monoclonal anti-FF-ISCOMS

Para la preparación de los anticuerpos monoclonales (Ac mo) contra los FF-ISCOMS, esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con 2 dosis FF-ISCOMS se fusionaron a células SP2. Los sobrenadantes de los clones positivos fueron titulados en un ensayo de ELISA contra homogenato total del parásito y se vio que 50 de ellos presentaron un elevado título de anticuerpos. Estos anticuerpos por ser los de mayor reactividad, se escogieron para analizar su especificidad por la técnica de Western Blot. Se observó que el 70 % de los anticuerpos ensayados reacciona contra proteínas entre 36 y 68 kDa (datos no mostrados).

Uno de estos anticuerpos, llamado TC2C123 inmunoprecipitó de un lisado de epimastigotes metabólicamente marcados con [³⁵S]-metionina 4 polipéptidos de 97, 58, 36-38 y 14 kDa (Fig. 9, calle a). El mismo patrón de bandas fue observado cuando TC2C123 se usó para precipitar proteínas de un homogenato total de epimastigotes marcado con [¹²⁵I] (Fig. 9 calle b). La Sepharosa 4B sin ligandos no precipitó ninguna proteína del parásito.

TC2C123 fue usado también para la purificación de antígenos por inmunoafinidad como se describió en la sección Materiales y Métodos. El pasaje de la fracción flagelar a través de ésta columna de afinidad permitió separar dicha fracción en dos subfracciones: el antígeno purificado por inmunoafinidad (Ag 123) y la fracción flagelar depletada de este antígeno (FT: del inglés flow through) (Fig. 10). El Ag 123 fue analizado en geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie Blue y se observaron las 5 bandas proteicas características de 97, 58, 36 y 38 y 14 kDa y 3 bandas adicionales de 66, 60 y 21 kDa (Fig. 9,

calle c). Por su parte, el material no retenido (FT) mostró en geles de acrilamida un complejo patrón de bandas entre 150 y 14 kDa, semejante al observado con la FF (datos no mostrados). La comparación de los patrones de bandas encontrados al inmunoprecipitar FF y FT con TC2C123 acoplado a Sepharosa indicó que 3 bandas de 97, 36 y 38 kDa fueron removidas completamente después del pasaje a través de la columna de afinidad (Fig. 11). Las bandas de 58 y 14 kDa fueron precipitadas por el anticuerpo monoclonal en la fracción FT. La Sepharosa 4B sin ligandos no precipitó ninguna proteína de estas subfracciones.

3.2.2 Respuesta linfoproliferativa inducida por las subfracciones de la FF en esplenocitos de ratones no inmunes

Para estudiar la capacidad de las subfracciones de la FF de inducir una respuesta linfoproliferativa, se usó un ensayo de proliferación en el cual esplenocitos de ratones BALB/c normales fueron estimulados durante 2 días con FF, FT, y el Ag 123. Los tiempos de incubación y dosis de antígenos óptimas fueron determinadas en experimentos preliminares. La incubación con 10 µg/ml de FT indujo una linfoproliferación 6 veces mayor que la observada en los controles no estimulados. La FF produjo una respuesta proliferativa significativamente inferior a la observada con FT pero aún 2 veces mayor que los valores del control. No se observaron diferencias significativas entre la incorporación de [³H]-timidina inducida por el Ag 123 y el control no estimulado (Fig.12). Esplenocitos cultivados en presencia de ovoalbumina (10 µg/ml) no estimularon la proliferación celular por encima de los valores controles.

3.2.3 Efecto inhibitorio del Ag 123 sobre la respuesta proliferativa mediada por Concanavalina A y FT

El hecho de que la linfoproliferación mediada por FT sea 4 veces mayor a la inducida por FF completa sugiere que la presencia del Ag 123 previene el desarrollo de esta respuesta. Para evaluar esta hipótesis, esplenocitos de ratones BALB/c fueron estimulados durante 4 días con Con A en presencia o ausencia del Ag 123. La figura 13 muestra que el Ag 123 (10 µg/ml) redujo en un 53 % la proliferación mediada por el mitógeno Con A.

Se evaluó también el efecto del Ag 123 sobre la respuesta proliferativa inducida por FT. La incubación con Ag 123 provocó una disminución del 72 % en la incorporación de [³H]-Timidina inducida por FT (Fig. 14). El cocultivo de FT o Con A con ovalbumina (10 µg/ml) no modificó la inducción de las respuestas proliferativas (datos no mostrados).

3.2.4 Respuesta linfoproliferativa inducida por las subfracciones de la FF en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con FF-ISCOMS

La proliferación celular inducida por las subfracciones de la FF se estudió en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con 2 dosis de FF-ISCOMS. Sesenta días después de la segunda dosis los bazo fueron removidos y los esplenocitos se estimularon durante 72 horas con 10 µg/ml de FF, FT, Ag 123 y FT junto con el Ag 123 (10 µg/ml). La figura 15 muestra que FT indujo una elevada linfoproliferación, 2 veces mayor a la evocada por la FF completa. La presencia del Ag 123 durante la estimulación con FT, redujo en un 37 % la incorporación

de [³H]-Timidina inducida por FT (Fig. 15). La FF produjo una respuesta proliferativa significativamente inferior a la observada con FT pero aún 5 veces mayor que el control. Por otro lado, el Ag 123 evocó una respuesta menor a las inducidas por FF o FT pero significativamente mayor que el control no estimulado. Esplenocitos cultivados con ovoalbumina (10 µg/ml) no proliferaron por encima del control negativo.

3.2.5 Efecto de un anticuerpo anti-TGF-β sobre la supresión de la proliferación mediada por el Ag 123.

TGF-β es una citoquina responsable de varias actividades inmunoregulatorias, incluyendo inhibición de la proliferación celular (Roberts & Sporn, 1990.). Entre sus muchas otras respuestas, se ha descrito que esta citoquina está involucrada en la inmunosupresión que ocurre durante la infección temprana con *Trypanosoma cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*. (Silva *et al.*, 1991) Tomando en consideración estas evidencias se estudió si el TGF-β estaba involucrado en la supresión de la respuesta proliferativa inducida por el Ag 123 . Para esto, esplenocitos de ratones BALB/c fueron estimulados con Con A en presencia del Ag 123, adicionando o no previamente un anticuerpo monoclonal anti-TGF-β. Los resultados de la figura 16 muestran que el anticuerpo anti-TGF-β produjo una significativa neutralización de la actividad supresora mediada por el Ag 123. La adición del anti-TGF-β no modificó *per se* la proliferación inducida por Con A en este ensayo.

3.2.6 El Ag 123 estimula la producción de TGF- β *in vivo* e *in vitro*

Dado que el efecto inhibitorio del Ag 123 sobre la respuesta proliferativa fue neutralizado por un anticuerpo monoclonal anti-TGF- β , se estudió si el Ag 123 inducía directamente la producción de esta citoquina. Para esto, ratones BALB/c fueron inyectados por vía intravenosa con FF (10 μ g), Ag 123 (5 μ g) o LPS (0.5 μ g). En experimentos de cinética preliminares, TGF- β se detectó de 1 a 5 hs post-inyección. Dos horas después de la inyección los animales fueron sangrados y el TGF- β se cuantificó en los sueros. mediante un ELISA como se describió en la sección Materiales y Métodos. Tanto la FF como el Ag 123 indujeron niveles de TGF- β significativamente mayores que los controles no inyectados (Fig. 17 A). No se observaron diferencias entre los niveles de TGF- β inducidos por LPS y el control negativo no inyectado (Fig. 17 A).

La producción de TGF- β fue también analizada *in vitro*. En este experimento, células de bazo de ratones BALB/c fueron estimuladas durante 24 hs con FF (10 μ g/ml), Ag 123 (5 μ g/ml) o LPS (10 μ g/ml) y se determinó la presencia de TGF- β en los sobrenadantes celulares. El Ag 123 indujo una cantidad de TGF- β 10 veces mayor que el control no estimulado (Fig. 17 B). Ni la FF, ni LPS produjeron niveles detectables de esta citoquina.

3.2.7 Determinación de la secuencia de aminoácidos de péptidos producidos por digestión en gel de dos proteínas presentes en el Ag 123

Las proteínas de 36 y 38 kDa que fueron completamente removidas del FT después del pasaje a través de la columna de afinidad

se escindieron de un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie Blue y se digirieron con tripsina como se describió en Materiales y Métodos. Los péptidos resultantes fueron separados por cromatografía líquida en fase reversa. Como se observa en la figura 18, los perfiles cromatográficos de los péptidos obtenidos a partir de ambas bandas proteicas coincidieron completamente. La secuencia de aminoácidos de 4 de estos péptidos fue determinada por degradación de Edman. Estas secuencias, las cuales corresponden a un total de 31 aminoácidos, se muestran en la Tabla II. El análisis de los bancos de datos (GeneBank y Swissprotein data base) mostró que estos péptidos presentan homología con las alfa-fetoproteínas de rata y humana.

3.2.8 Un anticuerpo anti-AFP humana precipita 2 proteínas de *T. cruzi* reconocidas por TC2C123

Como los péptidos provenientes de la proteína de 36 y 38 kDa mostraron homología con AFP humana, se estudió si un anticuerpo anti-AFP humana reaccionaba con proteínas del Ag 123. Para esto, un anticuerpo policlonal anti-AFP humana fue usado para inmunoprecipitar proteínas del homogenato total de parásito. Las proteínas precipitadas fueron lavadas, corridas en un gel de poliacrilamida 12 % y se transfirieron a nitrocelulosa para su detección por el anticuerpo monoclonal TC2C123 en Western blot. TC2C123 reconoció 3 bandas de 58, 38 y 36 kDa inmunoprecipitadas por anti-AFP humana (Fig. 19). TC2C123 no reaccionó con ninguna banda proteica cuando el homogenato total de parásito se inmunoprecipito con un anticuerpo anti-fosfatasa humana o con Sepharosa 4B.

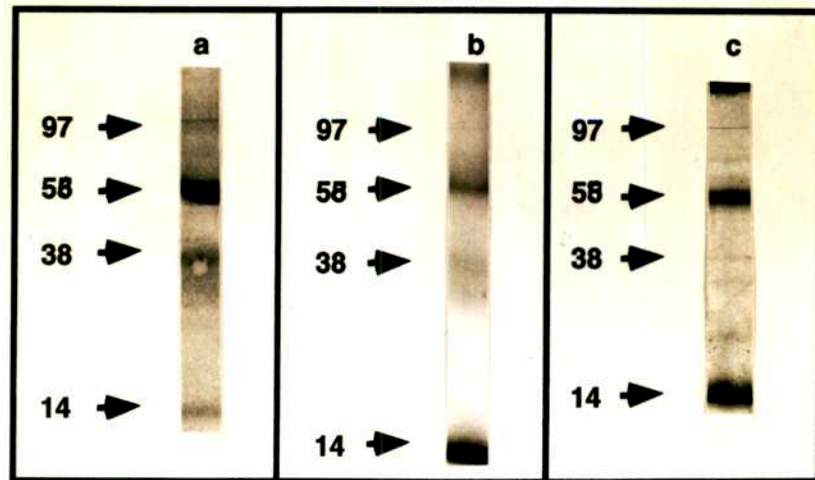


Figura 9: Análisis de las proteínas de *T. cruzi* inmunoprecipitadas por el anticuerpo monoclonal TC2C123. Un lisado de epimastigotes de la cepa Tulahuén marcados metabólicamente con [^{35}S]-metionina (a), o un lisado de epimastigotes marcado radiactivamente con [^{125}I] (b) fueron inmunoprecipitados con TC2C123 acoplado a Sepharosa 4B. El material precipitado se resuspendió en buffer de muestra y fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %. El gel fue luego secado y autorradiografiado. La calle c muestra el antígeno purificado por inmunoafinidad (Ag 123) en una columna preparada con TC2C123 acoplado a Sepharosa 4B, corrido en un gel de poliacrilamida 12 % y teñido con Coomasie Blue.

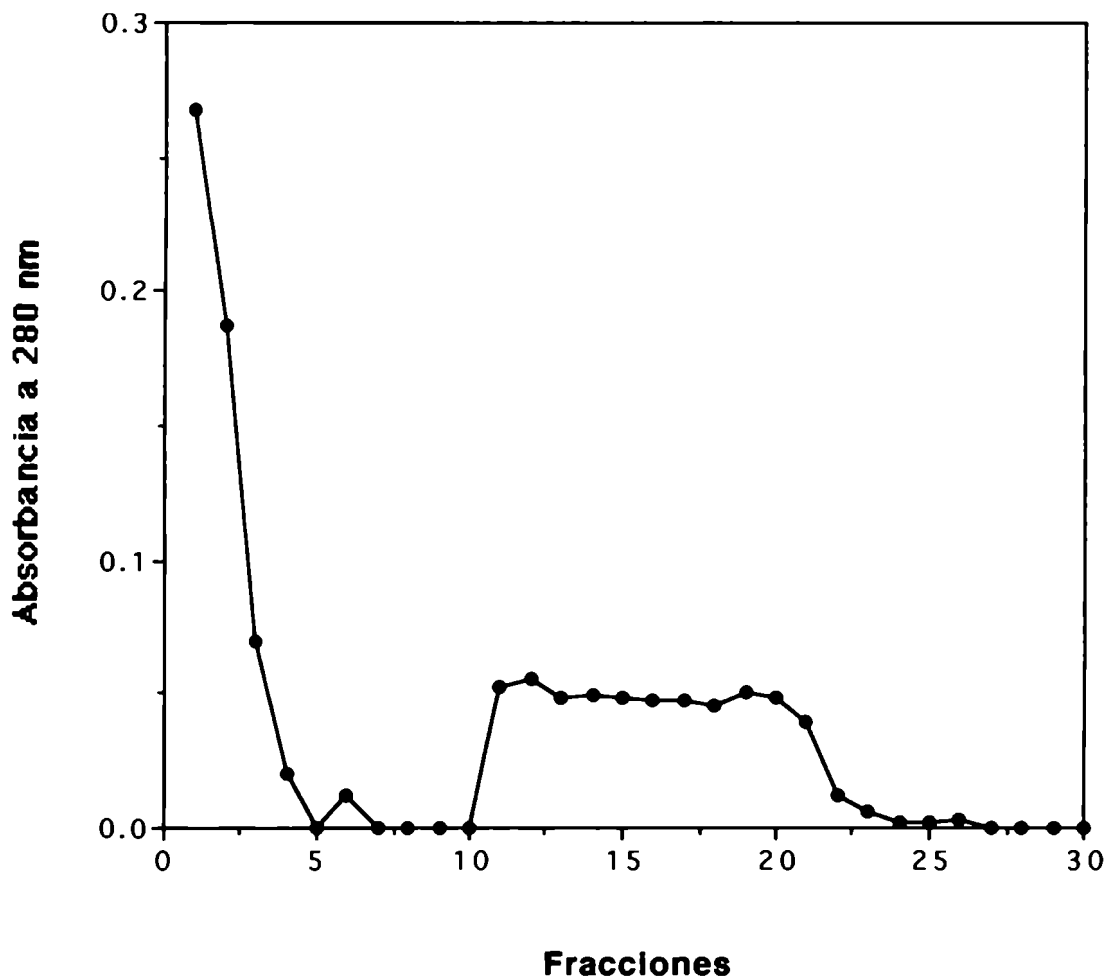


Figura 10: Purificación del Ag 123 por inmunoafinidad a partir de la fracción flagelar. La FF fue fraccionada usando una columna de afinidad preparada con el anticuerpo monoclonal TC2C123 acoplado a Sepharosa 4B activada con CnBr. Después del pasaje de la muestra la columna se lavó para recuperar el material no retenido (FT). El material específico (Ag 123) fue eluído con buffer Glicina pH 2.4.

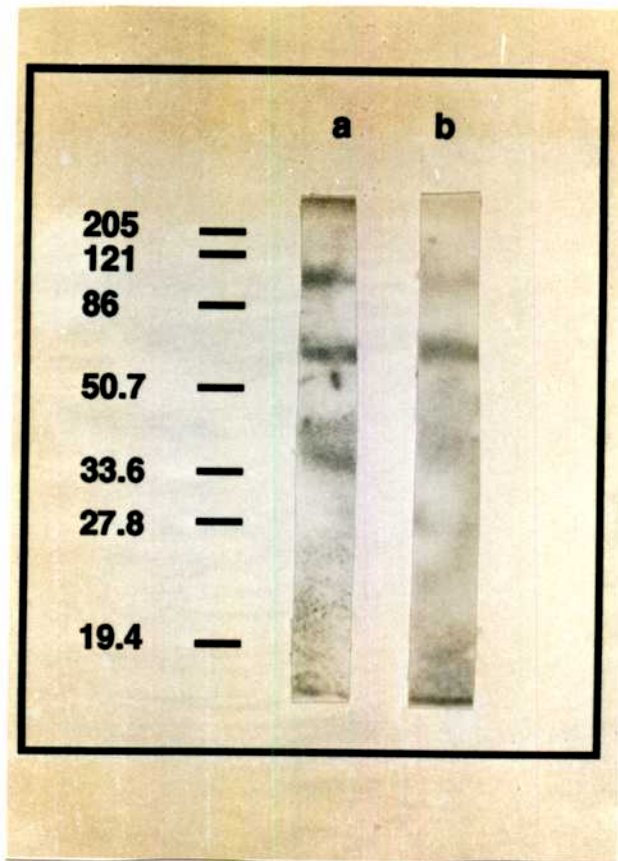


Figura 11: Análisis de las proteínas de FF y de FT inmunoprecipitadas por el anticuerpo monoclonal TC2C123. Las proteínas de FF (a) y de FT (b) biotiniladas fueron inmunoprecipitados con TC2C123 acoplado a Sepharose 4B. El material precipitado se resuspendió en buffer de muestra y fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. El gel fue luego transferido a nitrocelulosa y las bandas inmunoprecipitadas se detectaron con un conjugado estreptoavidina-peroxidasa.

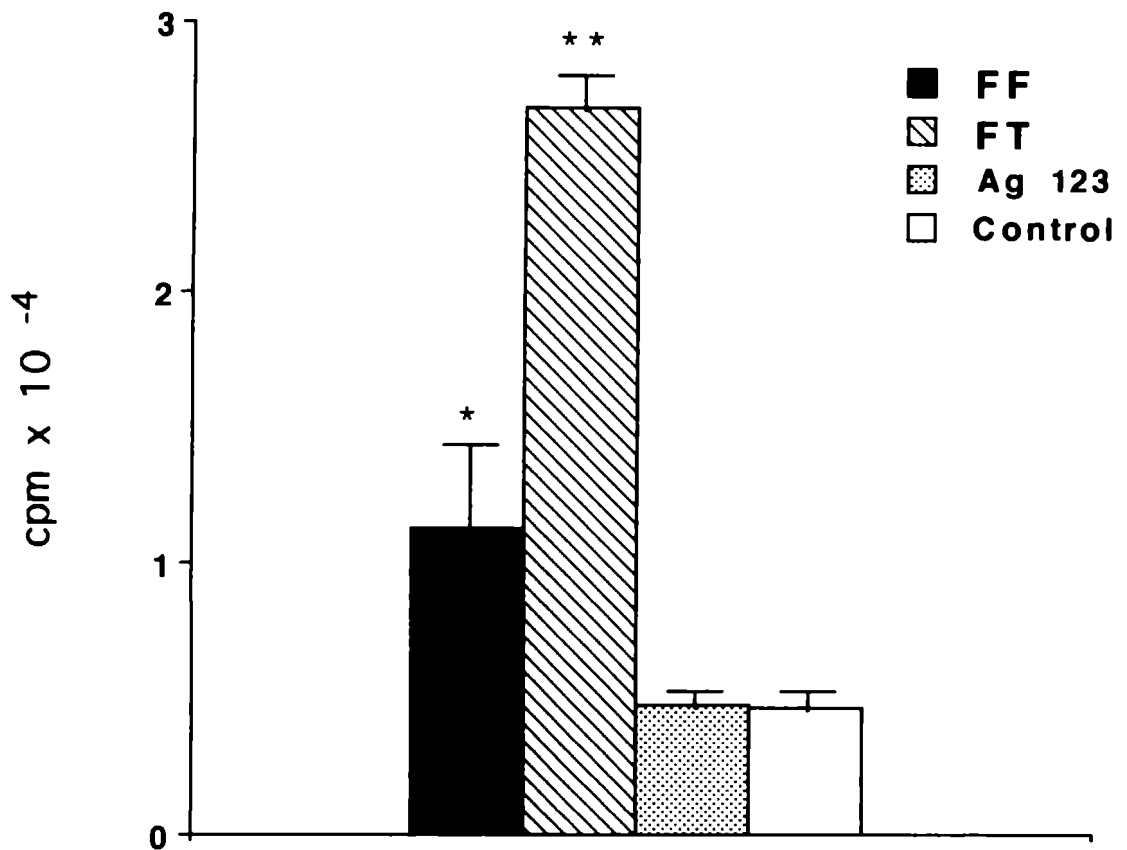


Figura 12: Respuesta linfoproliferativa inducida por las subfracciones de la FF en esplenocitos de ratones normales. Esplenocitos de ratones BALB/c se sembraron en medio RPMI-1640 en placas de microcultivo a una densidad de 2×10^6 células/ml y se estimularon durante 48 horas con $10 \mu\text{g/ml}$ de FF, FT o Ag 123. Células cultivadas con medio de cultivo solo se usaron como control negativo. Las barras representan el promedio de 4 muestras \pm DE. ** $p < 0.0005$ entre FF y FT, * $p < 0.05$ entre FF y el control negativo.

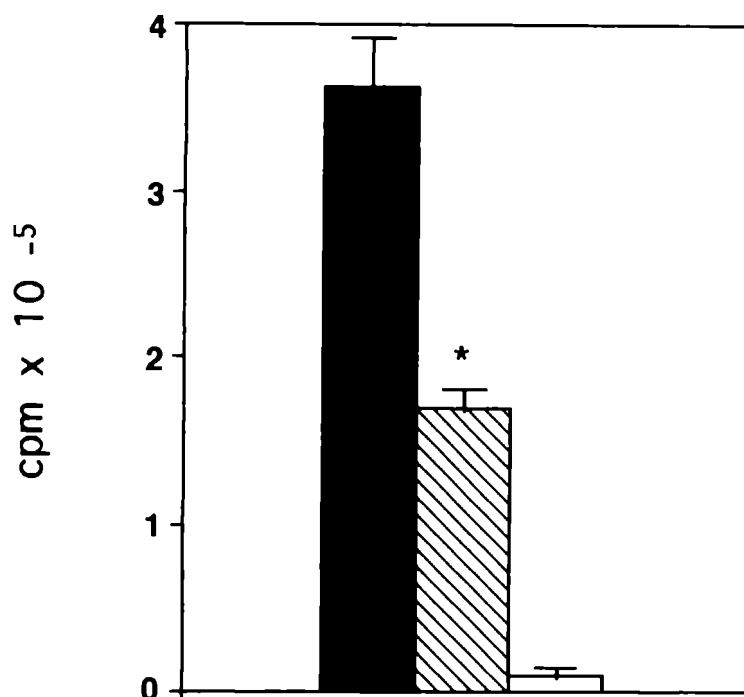


Figura 13: Efecto inhibitorio del Ag 123 sobre la respuesta linfoproliferativa inducida por Con A. Esplenocitos de ratones BALB/c normales se estimularon durante 4 días con Con A (5 $\mu\text{g/ml}$) en presencia (▨) o en ausencia del Ag 123 (10 $\mu\text{g/ml}$) (■). Células cultivadas con medio de cultivo solo se usaron como control negativo (□). Las barras representan el promedio de 4 muestras \pm DE, * $p < 0.05$ entre Con A y Con A incubado junto con el Ag 123.

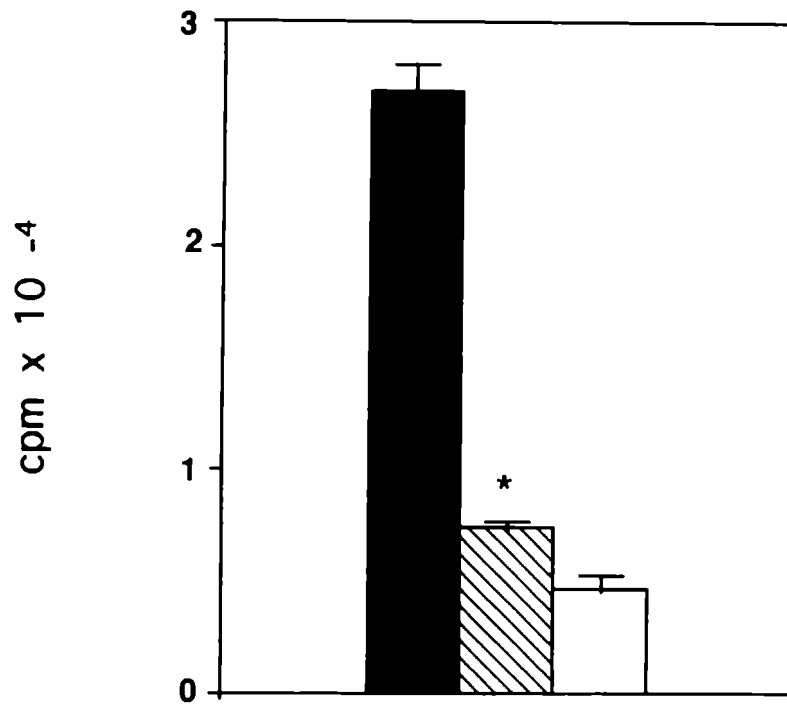


Figura 14: Efecto inhibitorio del Ag 123 sobre la respuesta linfoproliferativa inducida por FT. Esplenocitos de ratones BALB/c normales se estimularon durante 48 horas con FT (10 µg/ml) en presencia (▨) o en ausencia del Ag 123 (10 µg/ml) (■). Células cultivadas con medio de cultivo solo se usaron como control negativo (□). Las barras representan el promedio de 4 muestras ± DE, * $p < 0.001$ entre FT y FT incubado junto con el Ag 123.

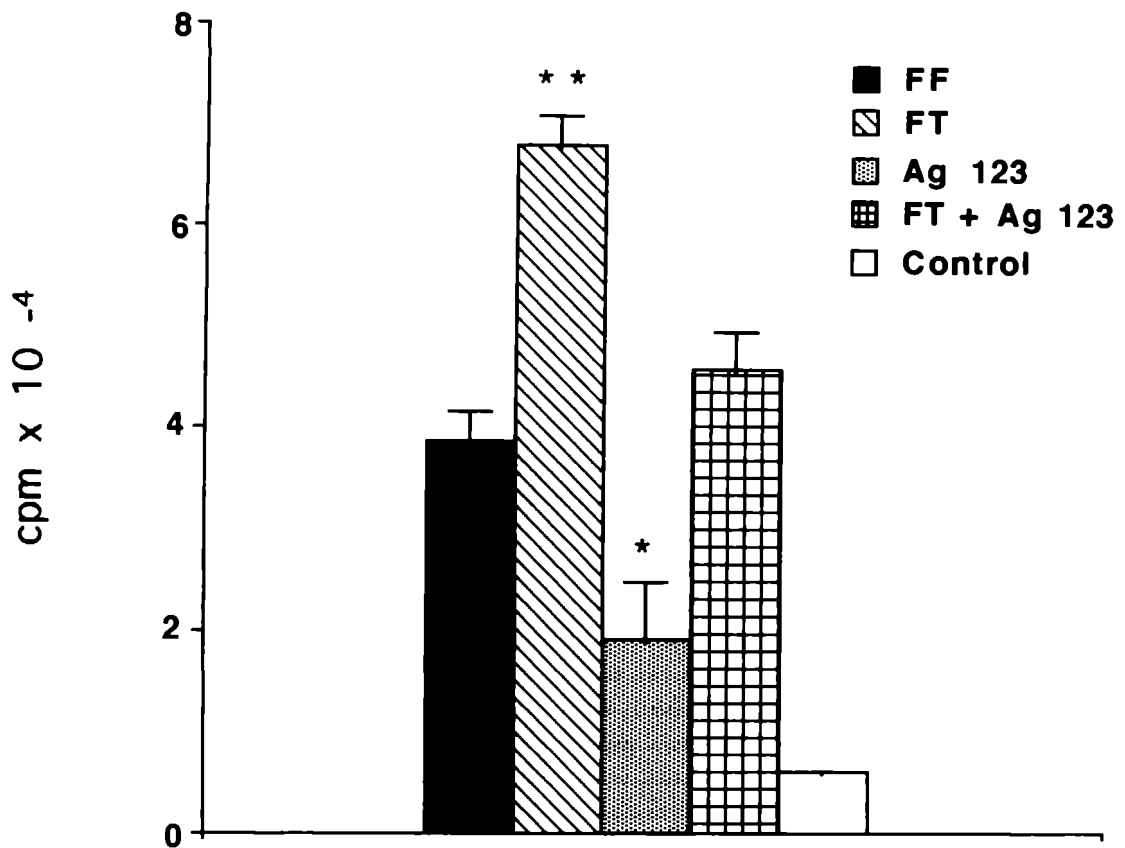


Figura 15: Respuesta linfoproliferativa inducida por las subfracciones de la FF en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con FF-ISCOMS. Células de bazo provenientes de ratones inmunizados con FF-ISCOMS se sembraron en medio RPMI-1640 y se estimularon durante 48 horas con 10 μ g/ml de FF, FT, Ag 123 o FT en presencia del Ag 123 (10 μ g/ml). Células cultivadas con medio de cultivo solo se usaron como control negativo. Las barras representan el promedio de 4 muestras \pm DE, ** $p < 0.005$ entre FF y FT, y entre FT y FT junto con el Ag 123, * $p < 0.05$ entre Ag 123 y el control negativo.

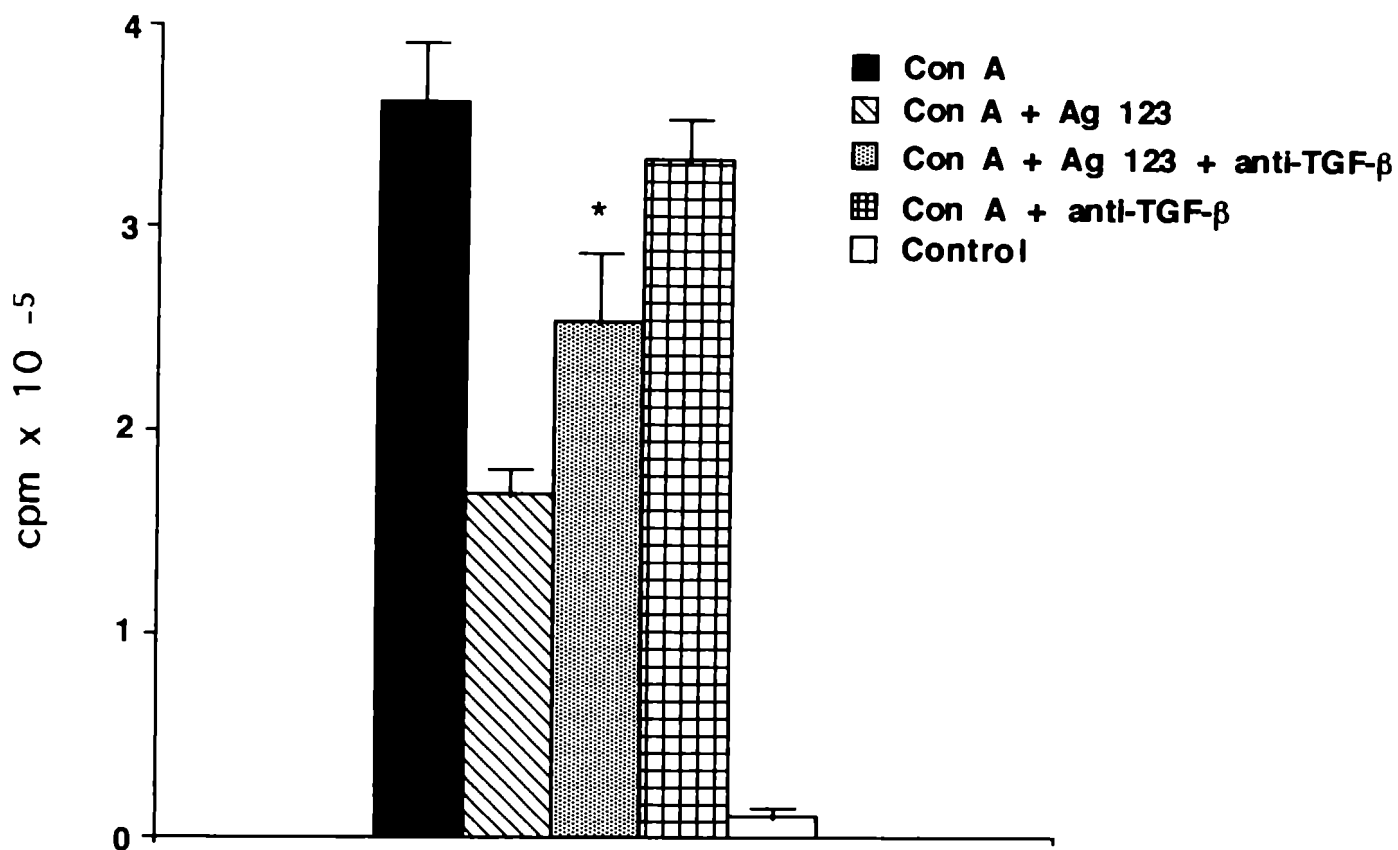


Figura 16: Un anticuerpo monoclonal anti-TGF-β neutraliza la supresión de la respuesta proliferativa mediada por el Ag 123. Esplenocitos de ratones BALB/c se estimularon con Con A en presencia o en ausencia del Ag 123 (10 µg/ml), adicionando o no previamente un anticuerpo monoclonal anti-TGF-β. Células cultivadas con medio de cultivo solo se usaron como control negativo. Las barras representan el promedio de 4 muestras ± DE, * p < 0.05 entre Con A + Ag 123 y Con A + Ag 123 preincubando con anti-TGF-β.

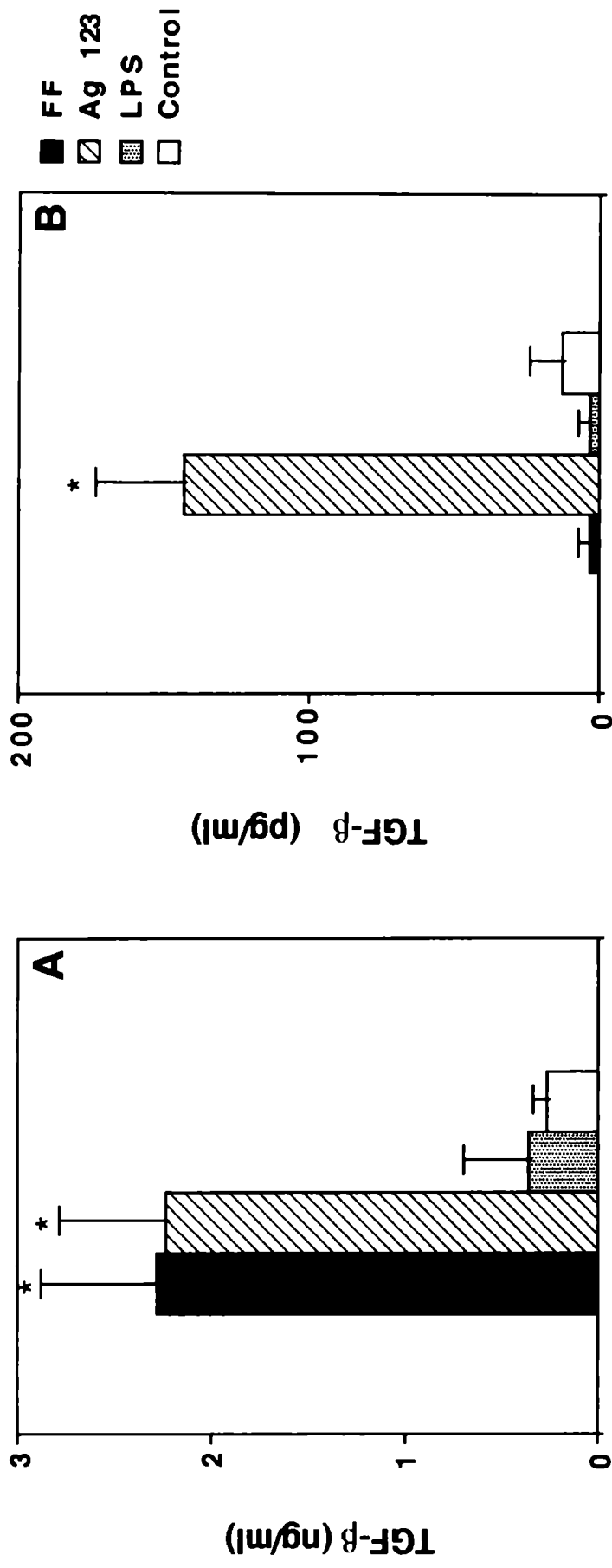


Figura 17: Niveles de TGF-β en sueros de ratones inyectados y en sobrenadantes de esplenocitos estimulados con FF, Ag 123, LPS o de controles no estimulados. **A.** Ratones BALB/c (n = 3) se inyectaron (i.v.) con FF (10 μg), Ag 123 (5 μg) y LPS (0.5 μg) y se determinó TGF-β en los sueros de los animales 2 horas después de realizada la inyección. Sueros de animales no inyectados se usaron como control negativo. **B.** Esplenocitos de ratones BALB/c se estimularon por 24 horas con FF (10 μg/ml), Ag 123 (5 μg/ml) y LPS (10 μg/ml) y se determinó TGF-β en los sobrenadantes celulares. Sobrenadantes de células crecidas con medio de cultivo solo se usaron como control negativo. * p < 0.05 entre tanto FF o Ag 123 y el control en la figura **A**, y entre Ag 123 y control en figura **B**.

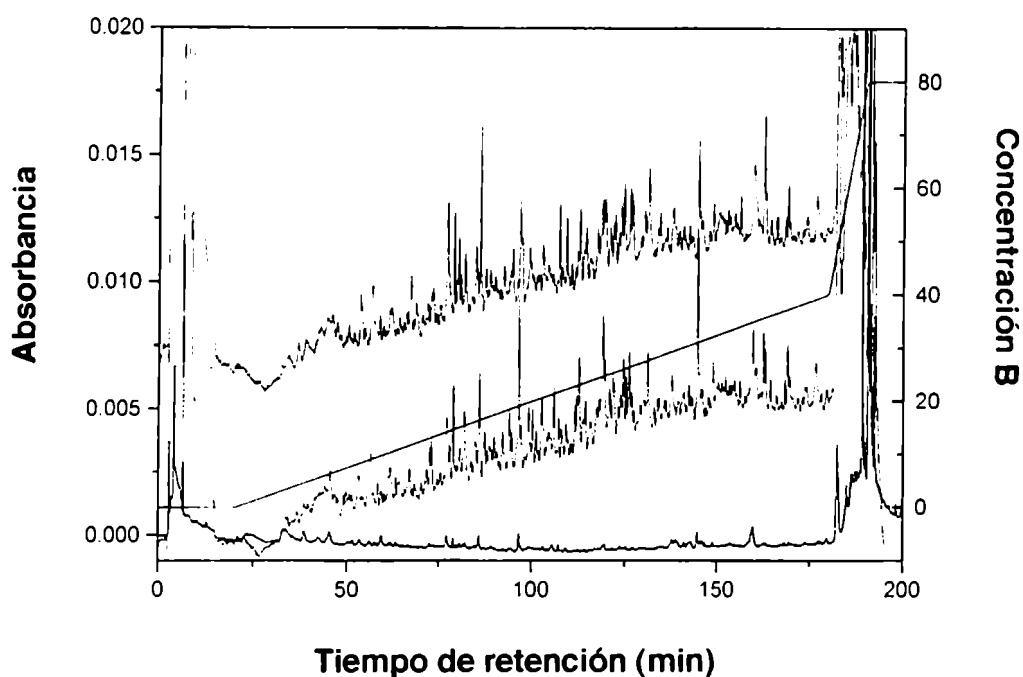


Figura 18: Separación cromatográfica de los péptidos producidos por digestión en-gel de las bandas proteicas de 36 y 38 Kd presentes en el Ag 123. Las proteínas de 36 y 38 Kd presentes en el Ag 123 fueron escindidas de un gel de poliacrilamida teñido con Coomasie Blue y digeridas como se describió en Materiales y métodos. Los peptidos resultantes se separaron por cromatografía líquida en fase reversa.

TABLA II. Secuencias de aminoácidos de cuatro de los péptidos producidos por digestión en-gel de las proteínas de 36 y 38 kDa presentes en el Ag 123 que mostraron homología con las alfa-fetoproteínas de humano y de rata.

Péptido de <i>T. cruzi</i>	YIQESQALAK	
Humano	YIQESQALAK	10/10
Rata	HIQESQALAK	9/10
Péptido de <i>T. cruzi</i>	FTYEYSR	
Humano	FVHEYSR	5/7
Rata	FLHEYSR	5/7
Péptido de <i>T. cruzi</i>	XXFLXXFLYE	
Humano	ETFMNKFIYE	4/6
Rata	AMSTNTFTYD	2/6
Péptido de <i>T. cruzi</i>	XKEYYLQNAF	
Humano	XKEYYLQNAF	8/8
Rata	LGPYYLQNLF	6/8

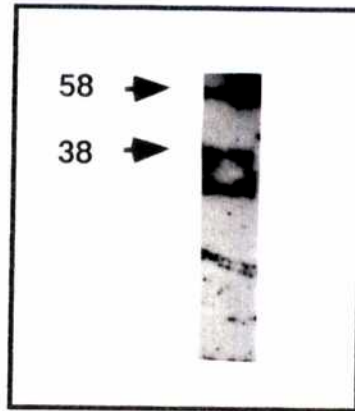


Figura 19: Análisis de las proteínas de *T. cruzi* inmunoprecipitadas por un anticuerpo anti-alfafetoproteína (AFP) humana. Proteínas del homogenato total de epimastigotes fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-AFP humana. El material precipitado se resuspendió en buffer de muestra y fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %. El gel fue luego transferido a nitrocelulosa y la bandas precipitadas se inmunodetectaron con el anticuerpo TC2C123 biotinilado. La aparición de bandas se detectó con un conjugado estreptoavidina-peroxidasa.

3.3 Tercera parte: Comparación entre la respuesta inmune inducida por la fracción flagelar y la estimulada por la fracción flagelar depletada del antígeno inmunosupresor 123

En la búsqueda de una vacuna capaz de conferir protección esterilizante contra el *Trypanosoma cruzi*, también se ha estudiado extensamente la naturaleza de los factores involucrados en la resistencia al parásito. Como se discutió anteriormente, una vacuna eficiente contra este parásito debería ser capaz de promover el desarrollo de las respuestas involucradas en la resistencia y además generar una memoria inmunológica tal que permitiera contrarrestar o sobrepasar la inmunosupresión que tiene lugar durante estadios tempranos de la infección y que parece facilitar la propagación del *T. cruzi* en el huésped.

El Ag 123 suprime la proliferación inducida por antígeno o mitógeno mediante un mecanismo dependiente de TGF- β . Esta citoquina, producida durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, bloquea los efectos protectivos mediados por IFN- γ , exacerbando la mortalidad y susceptibilidad de ratones infectados (Silva et al., 1991).

En estudios realizados *in vitro* observamos que la FF depletada del Ag 123 (FT) induce una respuesta proliferativa varias veces superior a la mediada por la FF completa (Sección 3.2). En esta sección se describe el efecto de inmunizaciones realizadas con el FT y con la FF completa. Se compararon la habilidad de ambas subfracciones celulares en inducir respuesta inmune humoral y celular y su capacidad de conferir protección ante un desafío parasitario.

3.3.1 Comparación entre la respuesta de anticuerpos inducida por la fracción flagelar y la fracción flagelar depletada del Ag 123 (FT)

La respuesta de anticuerpos fue medida por la técnica de ELISA en sueros de ratones BALB/c inmunizados via s.c., 3 veces con 10 μ g de FF o FT, usando matrix de ISCOMS como adyuvante (10 μ g). Sueros de ratones no inmunes fueron usados como control negativo. Se determinaron los títulos de anticuerpos a distintos tiempos después de cada una de las inmunizaciones. La figura 20 muestra que no se observaron diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos específicos totales inducidos por la FF o el FT después de la primera dosis, ni después de la segunda o tercera revacunación.

Se estudió también la distribución de isotipos en los sueros de ratones inmunizados con FF + matrix (FF/m) y FT + matrix (FT/m) a distintos tiempos después de la primera dosis y 2 semanas después de la segunda y la tercer revacunación. Los sueros de animales inmunizados con FF/m mostraron mayores títulos de IgM que los animales inmunizados con FT/m después de la primera dosis (Fig. 21 A). Por el contrario, los niveles de IgG₁ fueron superiores en los sueros de animales inmunizados con FT/m en comparación con aquellos de animales inmunizados con FF/m (Fig. 21 B). Sin embargo, este patrón de reactividad se revierte, ya que después de la segunda y tercer dosis los títulos de IgG₁ fueron más elevados en los animales inmunizados con FF/m que en los que recibieron FT/m (Fig. 22 A). De manera semejante, los sueros de animales inmunizados con FF/m presentaron mayores niveles de IgG₃ que los inyectados con FT/m después de la tercera dosis, sin observarse diferencias en ninguna de las dos dosis anteriores (Fig. 22 B). Por el contrario, los niveles de IgG_{2a} fueron superiores en los sueros de animales vacunados con

FT/m con respecto a los sueros de animales inmunizados con FF/m tanto después de la segunda como después de la tercera revacunación. Los isotipos IgG_{2b}, IgA e IgE no fueron detectados en ninguno de estos sueros a ninguno de los tiempos ensayados. Cabe señalar que en ambos grupos experimentales el isotipo más abundante fue el IgG₁, que mostró títulos dos órdenes de magnitud mayores que las subclases IgG_{2a} e IgG₃.

La especificidad de antisueros anti-FF/m y anti-FT/m se estudió por la técnica de Western blot. Un conjunto de antisueros anti-FF/m detectó 1 banda mayoritaria de 44 kDa y 2 bandas menores de 73-45 y 40-37 kDa sobre homogenato total de parásito (Fig. 23). Sueros de ratones inmunizados con FT/m reconocieron un número mayor de bandas que los sueros de animales inmunizados con FF/m. Estos anticuerpos reconocieron 5 bandas de 84, 80, 73-45, 44 y 40-37 kDa (Fig. 23).

3.3.2 Respuesta inmune mediada por células inducida por FF y FT

La respuesta inmune celular fue evaluada midiendo la linfoproliferación mediada por antígenos, la secreción de citoquinas y la respuesta de hipersensibilidad tardía. Para medir la respuesta linfoproliferativa y la secreción de citoquinas producidas por células linfocíticas, se inmunizaron ratones BALB/c 2 veces con 10 µg de FF o FT por vía subcutánea, usando matrix de ISCOMS como adyuvante (10 µg). Sesenta días después de la segunda dosis los animales se sacrificaron, los bazo se removieron asepticamente y los esplenocitos fueron estimulados con 10 µg/ml de FF o FT durante 4 días. La respuesta proliferativa de esplenocitos de ratones inmunizados con FT/m fue significativamente mayor a la observada en aquellos

provenientes de animales inyectados con FF/m al estimular *in vitro* con FT (Fig. 24 A) así como también al estimular con FF (Fig. 24 B). Células provenientes de animales inmunizados con FT/m cultivadas sin estimulación, mostraron una proliferación aproximadamente 6 veces mayor que aquellas provenientes de animales inmunizados con FF/m (Fig. 24 C).

Los esplenocitos de ratones inmunizados con FT/m produjeron niveles significativamente mayores de IL-4 que las células provenientes de animales inmunizados con FF/m, al reestimar *in vitro* con FT (Fig. 25 A). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas durante los cuatro días de estimulación cuando ambos tipos de células fueron reestimulados con FF (Fig. 25 B). Células provenientes de animales inmunizados con FT/m, crecidas en medio de cultivo sin aditivos produjeron elevados niveles de IL-4, mientras que en sobrenadantes de aquellas provenientes de animales inmunizados con FF/m no se detectó IL-4 en ninguno de los tiempos ensayados (Fig. 25 C). Tanto en sobrenadantes de esplenocitos provenientes de animales inmunizados con FT/m o FF/m, la reestimulación *in vitro* con FF indujo niveles mas elevados de IL-4 que cuando las células fueron estimuladas con FT (comparar Fig. 25 A con Fig. 25 B).

IL-10 fue detectable después de 3 días de estimulación en todos los grupos ensayados. En este caso, sobrenadantes de celulas de animales inmunizados con FT/m presentaron niveles mas elevados que los de FF/m, tanto cuando se estimuló con FT (Fig. 26 A) o con FF (Fig. 26 B). Células de ratones inmunizados con FT/m mostraron una producción espontánea de IL-10 cuando se incubó solamente con medio de cultivo y no se detectó esta citoquina bajo estas condiciones, en esplenocitos de ratones inmunizados con FF/m (Fig. 26 C). La FF

estimuló *in vitro* una respuesta levemente mayor que el FT sólo después de 4 días de estimulación tanto en células de ratones inmunizados con FT/m o FF/m (comparar Fig. 26 A con Fig. 26 B).

Cuando se midieron los niveles de IL-2, se observó que esplenocitos de ratones inmunizados con FT/m produjeron mayores cantidades de esta citoquina que los de ratones inmunizados con FF/m tanto al estimular *in vitro* con FT (Fig. 27 A). como con FF (Fig. 27 B). Al igual que lo observado con las citoquinas anteriores, células de ratones inmunizados con FT/m mostraron altos niveles de IL-2 cuando se incubó solamente con medio de cultivo y no se detectó esta citoquina en esplenocitos de ratones inmunizados con FF/m bajo estas condiciones (Fig. 27 C). Tanto en sobrenadantes de esplenocitos de animales inmunizados con FT/m o FF/m, la reestimulación *in vitro* con FF indujo niveles más elevados de IL-2 que cuando las células fueron estimuladas con FT (comparar Fig. 27 A con Fig. 27 B).

Los niveles de IFN- γ detectados en sobrenadantes de esplenocitos provenientes de animales inmunizados con FT/m fueron significativamente mayores que aquellos detectados en sobrenadantes de células provenientes de animales inmunizados con FF/m, tanto al reestimar *in vitro* con FT (Fig. 28A) como con FF (Fig. 28 B). Esplenocitos de animales inmunizados con FT/m, indujeron elevados niveles de IFN- γ , aún sin recibir estimulación *in vitro*, mientras que no se detectó esta citoquina en sobrenadantes de células de animales inmunizados con FF/m bajo condiciones controles (Fig. 28 C). A diferencia de lo observado con IL-2, IL-4 e IL-10 la reestimulación *in vitro* con FT indujo niveles mayores de IFN- γ que al estimular con FF, tanto en esplenocitos de ratones inmunizados con FT/m como con FF/m (comparar Fig. 28 A con Fig. 28 B).

La inducción de productos de macrófagos, IL-1 y IL-6, evocada por FT y FF se estudió *in vitro* estimulando macrófagos peritoneales de ratones BALB/c con 10 µg de FT o FF durante 24 hs. Los niveles de IL-1 presentes en sobrenadantes de macrófagos estimulados con FT fueron 14 veces más altos que aquellos de sobrenadantes de células estimuladas con FF. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de IL-1 inducidos por la FF y los controles no estimulados (Fig. 29). De manera semejante, la incubación de macrófagos peritoneales con FT indujo una producción de IL-6 100 veces mayor que el control. No se observaron diferencias entre los niveles de IL-6 inducidos por la FF y el control no estimulado (Fig. 30).

La respuesta de hipersensibilidad tardía medida en ratones BALB/c inmunizados 2 veces (s.c.) con 10 µg de FT fue significativamente mayor que la respuesta inducida por animales inmunizados con las mismas dosis de FF o que los controles no inmunes (Fig. 31).

3.3.3 Niveles de protección conferidos por FT/m y FF/m ante un desafío parasitario

Ratones BALB/c inoculados con 3 dosis de 10 µg (vía s.c.), separadas por intervalos de 5 y 4 semanas, de FT o FF usando matrix de ISCOMS como adyuvante (10 µg) fueron desafiados por vía intraperitoneal con 1000 tripomastigotes metacíclicos, 30 días después de la última dosis. A los 18 y 21 días post-infección los animales inmunizados con FF/m mostraron niveles de parasitemia mas elevados (Fig. 32) y una menor sobrevida (Fig. 33) que los ratones inmunizados con FT/m y que los controles no inmunizados. Veintiocho días después de realizada la infección los animales inmunizados con FT/m

mostraron niveles de parasitemia significativamente menores que los de ratones inmunizados con FF/m y que los controles no inmunizados (Fig. 32). Al día 38 post-infección 75 % de los animales inmunizados con FT/m sobrevivieron, observándose negativización de la parasitemia, mientras que ninguno de los animales inoculados con FF/m o no inmunizados permanecieron vivos (Fig. 33).

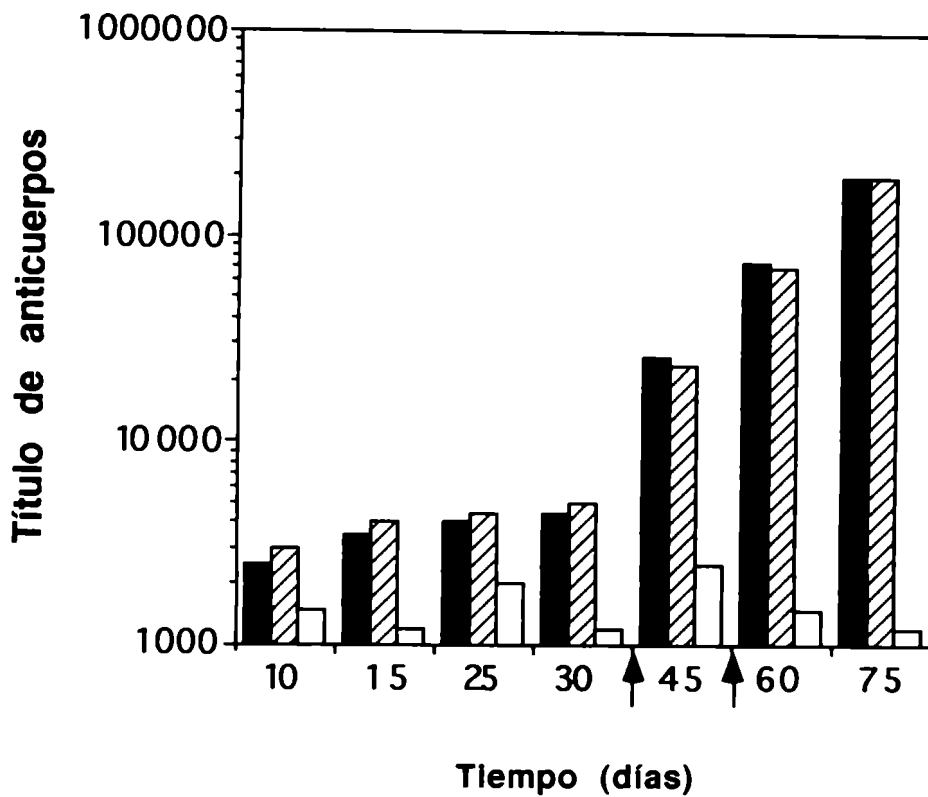


Figura 20: Títulos de anticuerpos en sueros de ratones BALB/c inmunizados 3 veces con 10 µg de FF y matrix (▨) o FT y matrix (■). Los niveles de anticuerpos fueron determinados mediante un ELISA contra FF a distintos tiempos después de cada inmunización según se indica en la figura. Sueros de animales no inmunizados se usaron como control negativo (□). Las flechas indican el momento en que fueron realizadas las 2 revacunaciones. Cada barra representa el título de anticuerpos proveniente de un conjunto de 8 sueros.

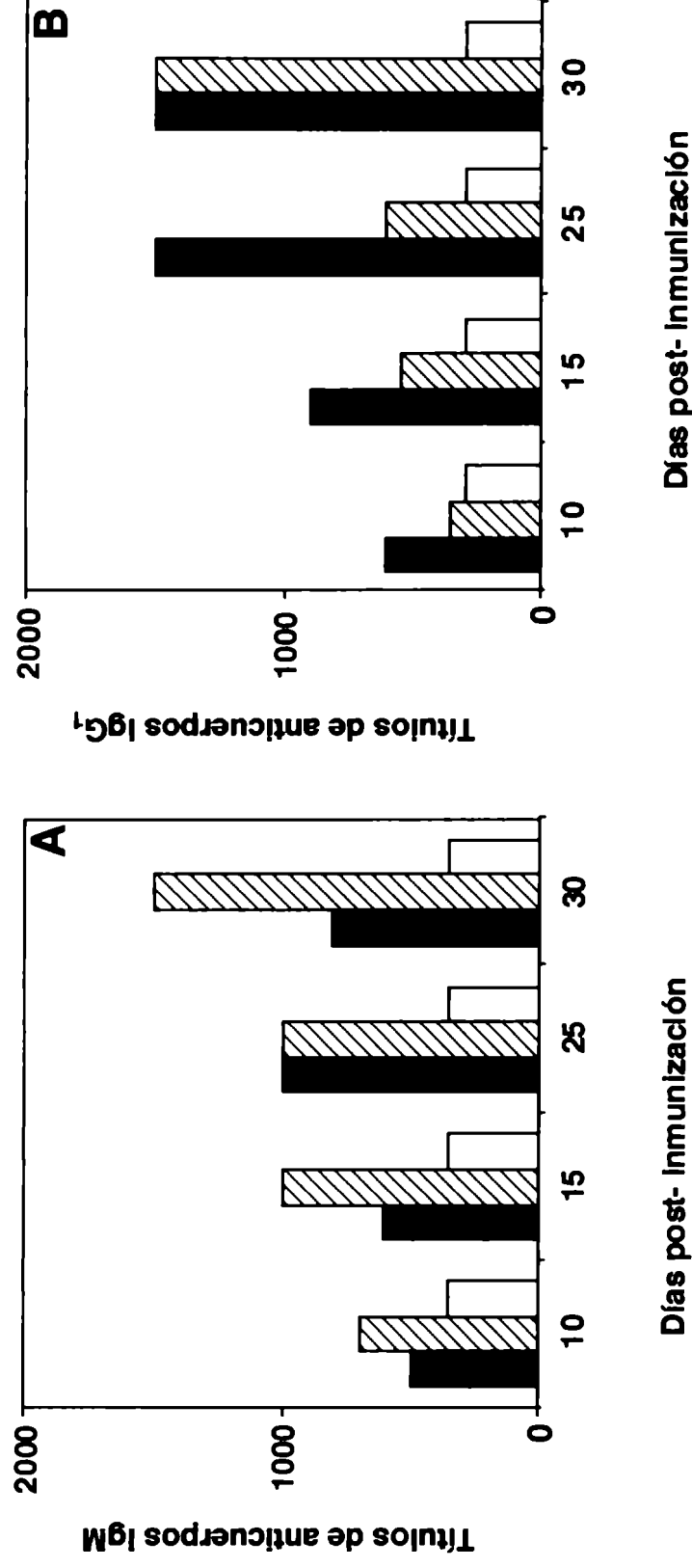


Figura 21: Títulos de anticuerpos IgM (A) e IgG1 (B) en sueros de ratones inmunizados con 10 días μg de FF y matrix (▨) o FT y matrix (■). Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante un ELISA contra FF a distintos tiempos después de una inmunización según se indica en la figura. Sueros de animales no inmunizados se usaron como control negativo (□). Cada barra representa el título de anticuerpos proveniente de un conjunto de 8 sueros.

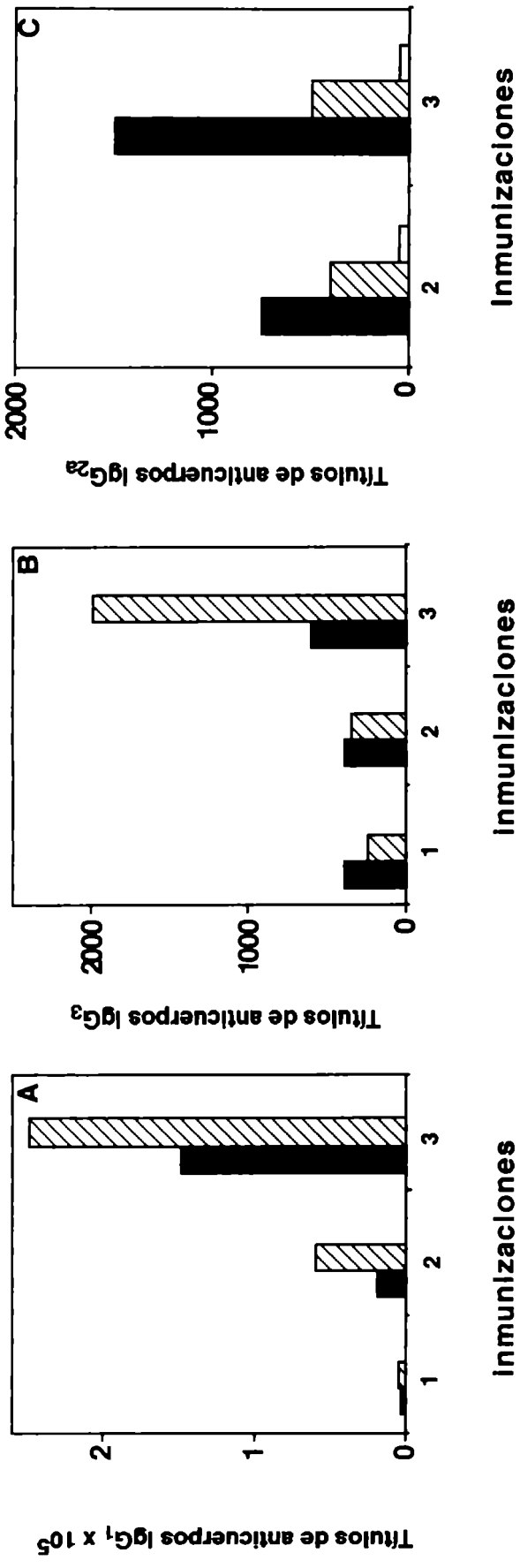


Figura 22: Títulos de anticuerpos IgG₁ (A), IgG₃ (B) e IgG_{2a} (C) en sueros de ratones inmunizados 3 veces con 10 µg de FF y matrix (▨) o FT y matrix (■). Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante un ELISA contra FF después de cada inmunización. Sueros de animales no inmunizados se usaron como control negativo (□). Cada barra representa el título de anticuerpos proveniente de un conjunto de 8 sueros.

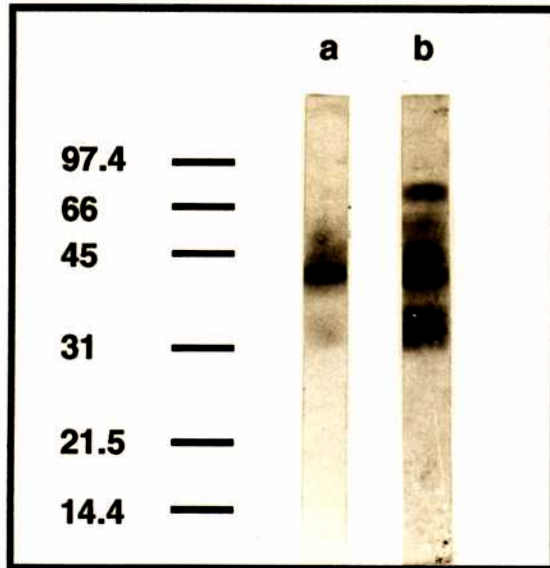
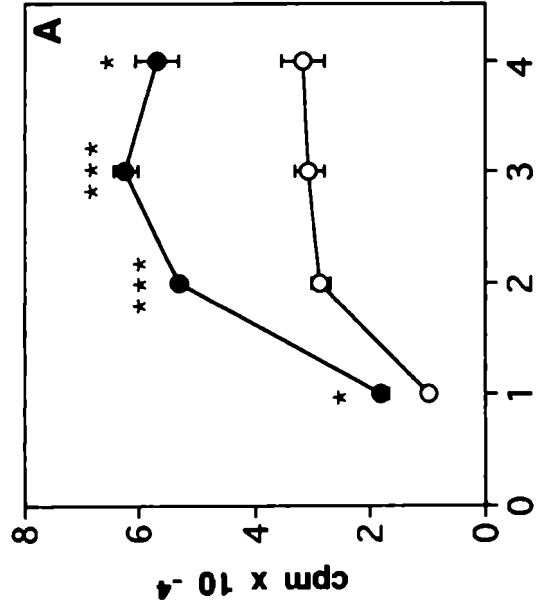
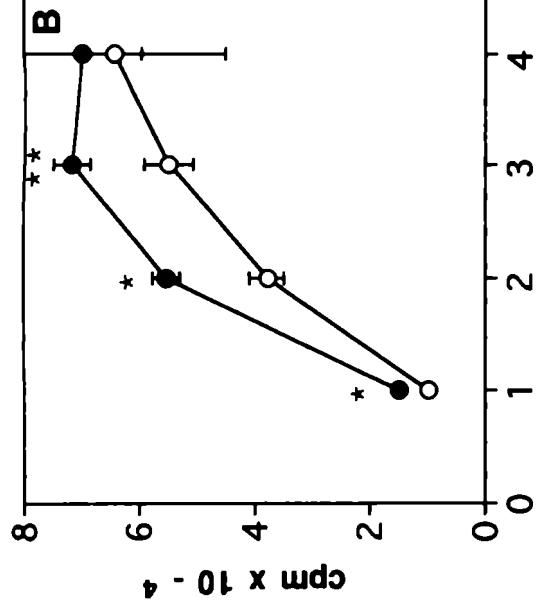


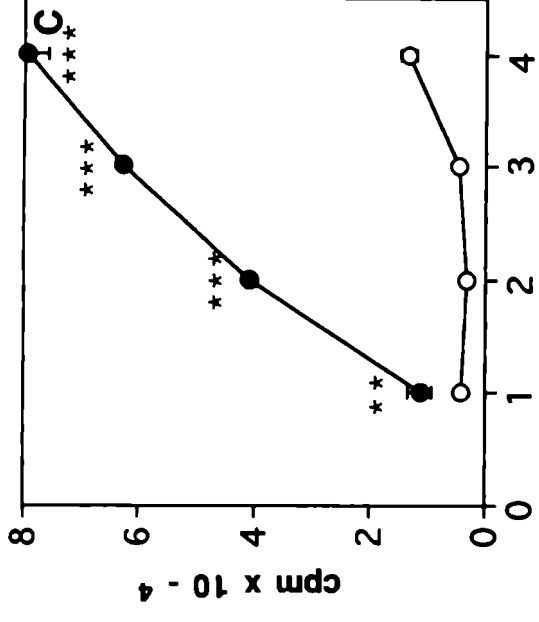
Figura 23: Reactividad de sueros de ratones inmunizados con 3 dosis de 10 µg de FF y matrix (**a**) o FT y matrix (**b**) en Western blot. Proteínas de homogenato total de parásito se corrieron en un gel de poliacrilamida 12 % con SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para Western blot. Como anticuerpo secundario se usó un anti IgG de ratón conjugado a la enzima fosfatasa alcalina. Las bandas proteicas fueron reveladas con NBT y BCIP.



Días de estimulación



Días de estimulación



Días de estimulación

Figura 24: Respuesta linfoproliferativa en esplenocitos de ratones inmunizados con 2 dosis de 10 µg de FT y matrix o FF y matrix reestimulados *in vitro*. Células de bazo de ratones BALB/c (n = 4) inmunizados con FT y matrix (●) o FF y matrix (○) fueron estimuladas durante 4 días con 10 µg/ml de FT (A), FF (B) o en presencia de medio de cultivo sin aditivos (C). Cada punto representa el promedio ± DE de 4 muestras determinadas, *** p < 0.0005, ** p < 0.005, * p < 0.05, * p < 0.01 respuestas pareadas de células de animales inmunizados con FF y matrix o FT y matrix.

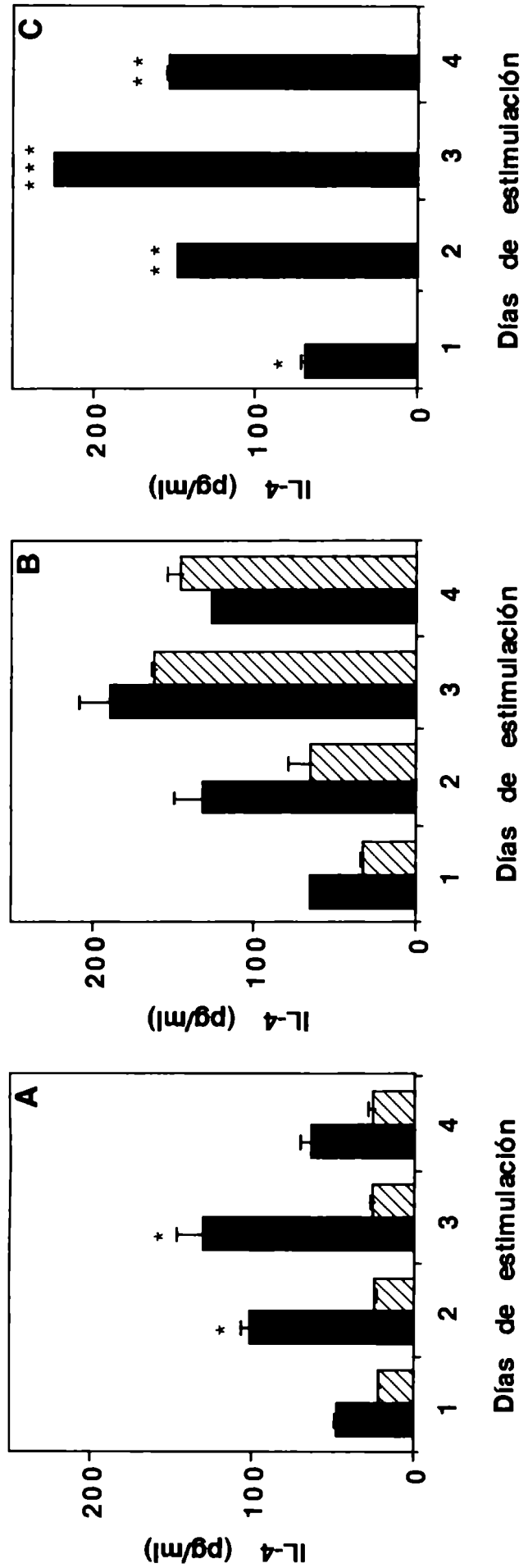


Figura 25: Niveles de IL-4 en sobrenadantes de esplenocitos provenientes de ratones (n = 4) inmunizados con 2 dosis de 10 µg de FT y matrix (■) o FF y matrix (▨) después de reestimulación *in vitro*. Las células se estimularon con 10 µg/ml de FT (A), FF (B) o se cultivaron en medio sin aditivos (C). La IL-4 se determinó por duplicado en sobrenadantes celulares durante 4 días de estimulación usando un ELISA de captura, *** p < 0.0005, ** p < 0.005, * p < 0.05.

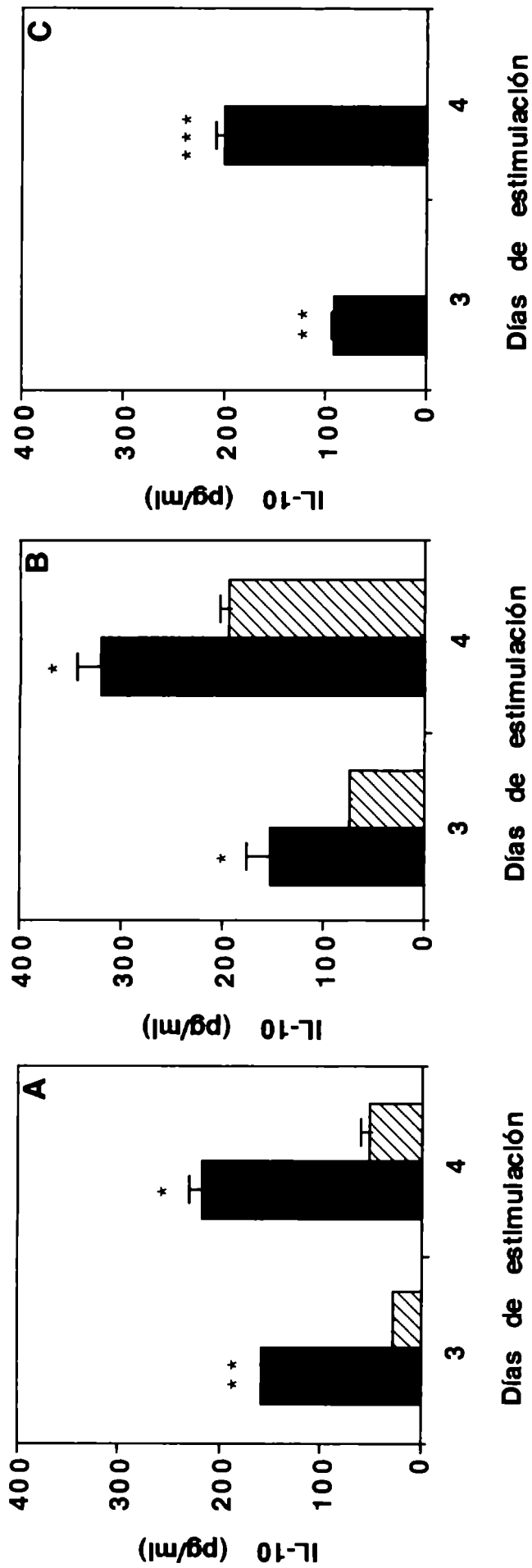


Figura 26: Niveles de IL-10 en sobrenadantes de esplenocitos provenientes de ratones ($n = 4$) inmunizados con 2 dosis de $10 \mu\text{g}$ de FT y matrix o (■) FF y matrix (▨) después de reestimulación *in vitro*. Las células se estimularon con $10 \mu\text{g/ml}$ de FT (A), FF (B) o se cultivaron en medio sin aditivos (C). La IL-10 se determinó por duplicado en sobrenadantes celulares del día 3 al 4 de estimulación usando un ELISA de captura, *** $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

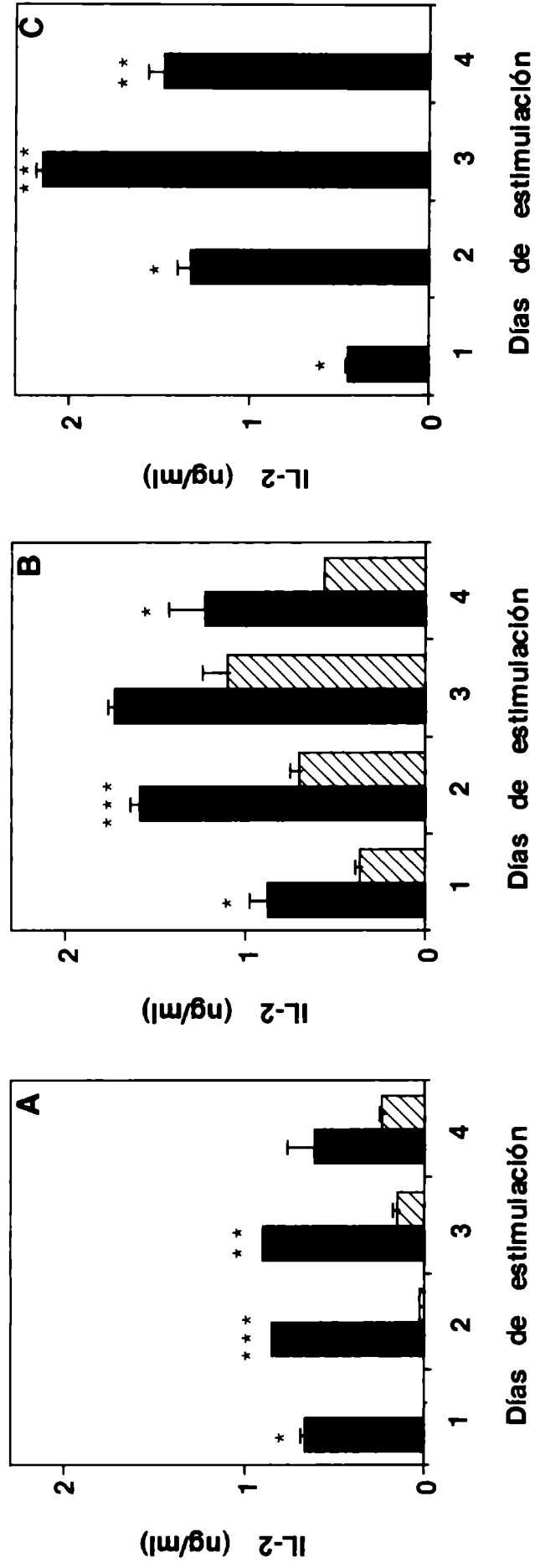


Figura 27: Niveles de IL-2 en sobrenadantes de esplenocitos provenientes de ratones (n = 4) inmunizados con 2 dosis de 10 μg de FT y matrix (■) o FF y matrix (▨) después de reestimulación *in vitro*. Las células se estimularon con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FT (A), FF (B) o se cultivaron en medio sin aditivos (C). La IL-2 se determinó por duplicado en sobrenadantes celulares durante 4 días de estimulación usando un ELISA de captura, *** p < 0.005, ** p < 0.01, * p < 0.05.

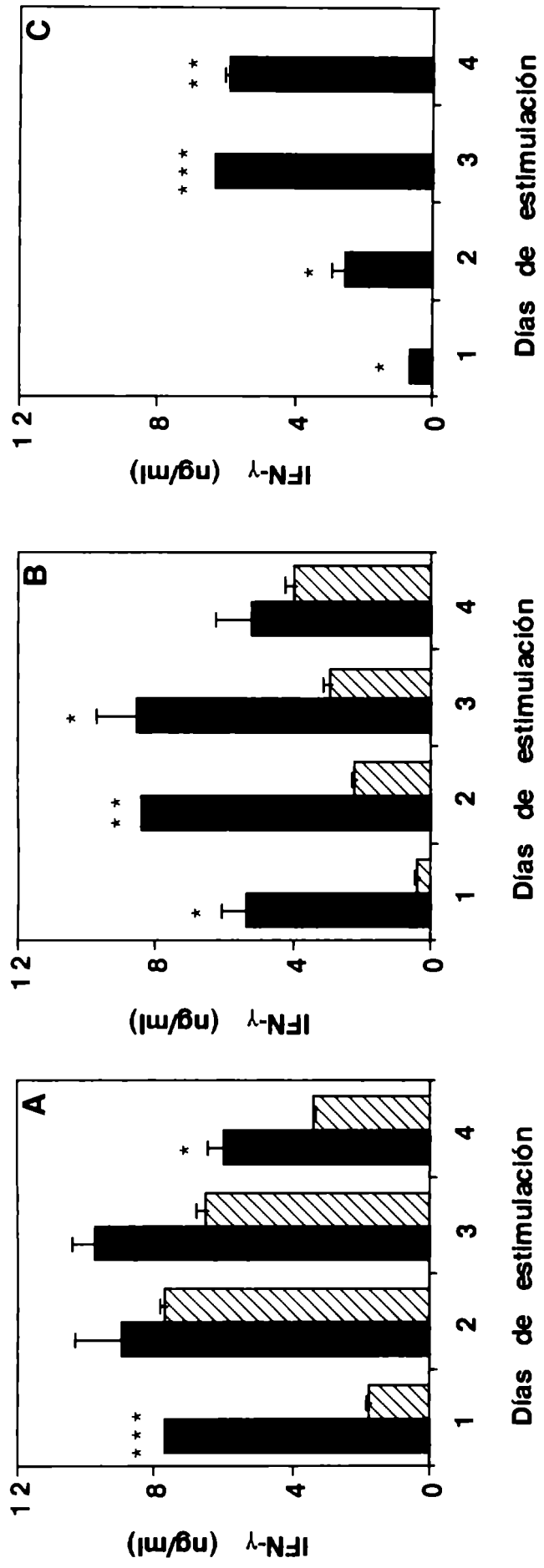


Figura 28: Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de esplenocitos provenientes de ratones ($n = 4$) inmunizados con 2 dosis de 10 μg de FT y matrix (■) o FF y matrix (▨) después de reestimulación *in vitro*. Las células se estimularon con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FT (A), FF (B) o se crecieron en presencia de medio de cultivo sin aditivos (C). El IFN- γ se determinó por duplicado en sobrenadantes celulares durante 4 días de estimulación usando un ELISA de captura, *** $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

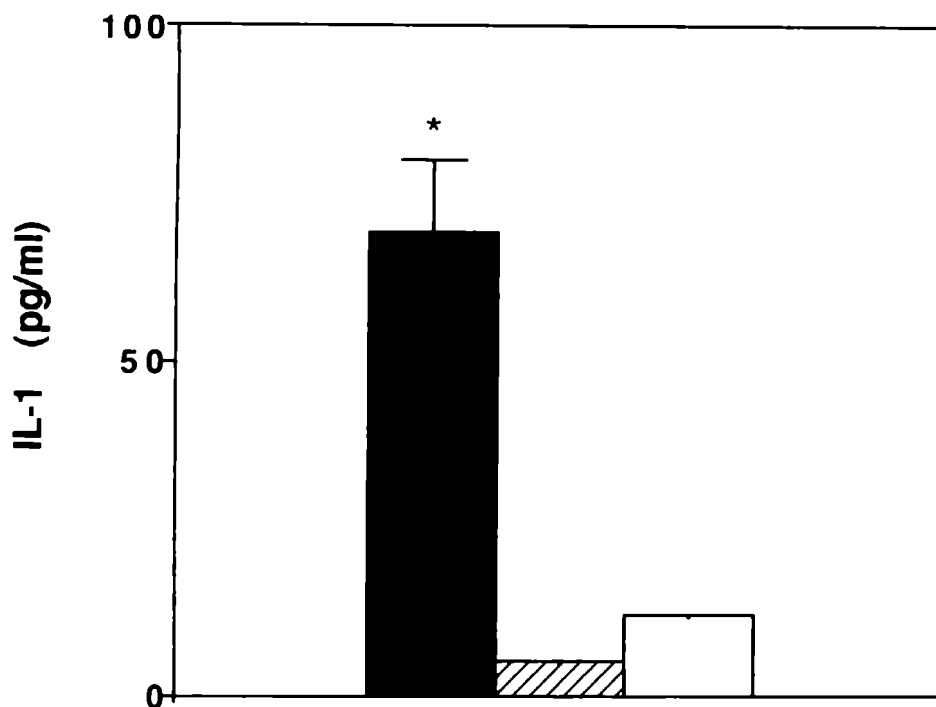


Figura 29: Niveles de IL-1 en sobrenadantes de macrófagos peritoneales estimulados con FT o FF. Células peritoneales de ratones BALB/c se sembraron en medio RPMI-1640 y se estimularon con 10 μ g/ml de FT (■) o FF (▨) durante 24 horas. Células incubada en medio de cultivo solo se usaron como control (□). La IL-1 se determinó en los sobrenadantes celulares por triplicado usando un ELISA de captura, * $p < 0.05$ entre FT y FF.

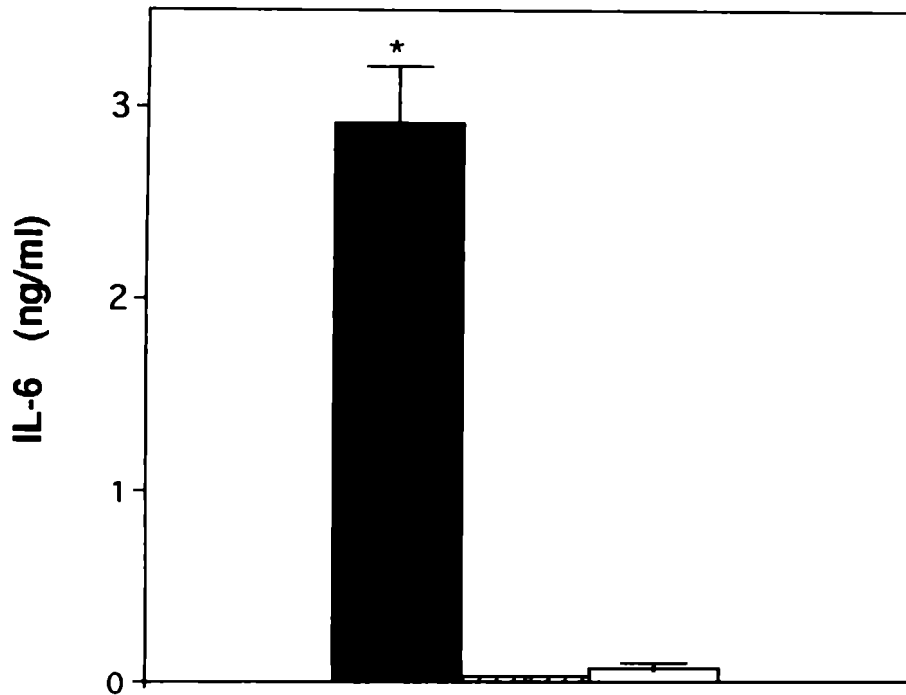


Figura 30: Niveles de IL-6 en sobrenadantes de macrófagos peritoneales estimulados con FT o FF. Células peritoneales de ratones BALB/c se sembraron en medio RPMI-1640 y se estimularon con 10 μ g/ml de FT (■) o FF (▨) durante 24 horas. Células incubadas en medio de cultivo solo se usaron como control (□). La IL-6 se determinó en los sobrenadantes celulares por triplicado usando un ELISA de captura, * $p < 0.05$ entre FT y FF.

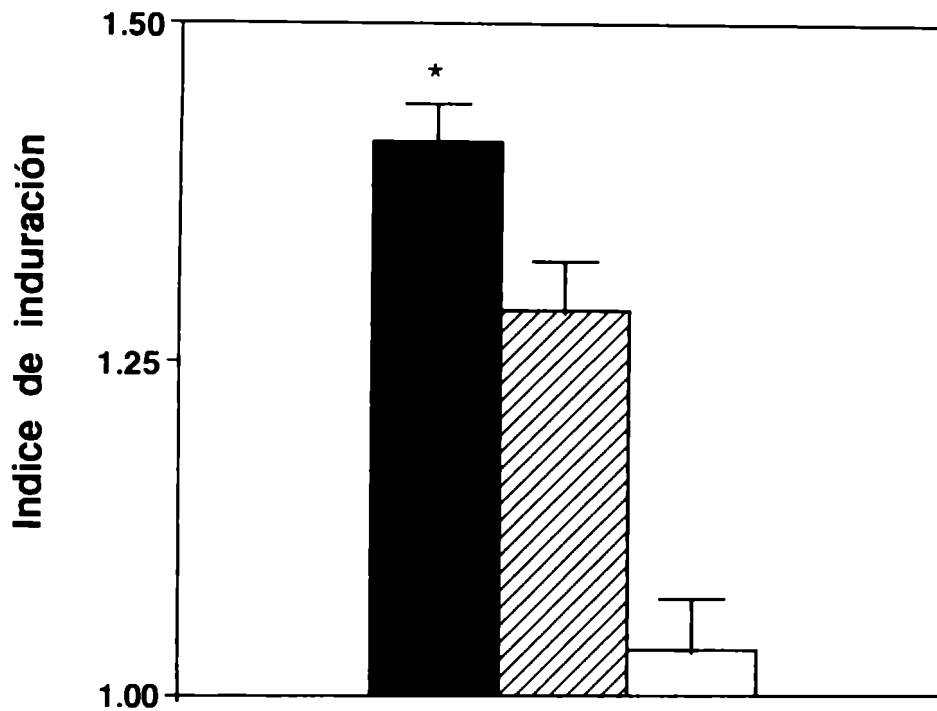


Figura 31: Respuesta de hipersensibilidad tardía en ratones BALB/c inmunizados con FT (■), FF (▨) y controles no inmunizados (□). Los animales fueron inmunizados con 2 dosis de 10 μ g de cada preparación separadas por un intervalo de 5 semanas. Las barras representan el promedio \pm DE de índice de inducción de 6 ratones, * $p < 0.05$ entre FT y FF.

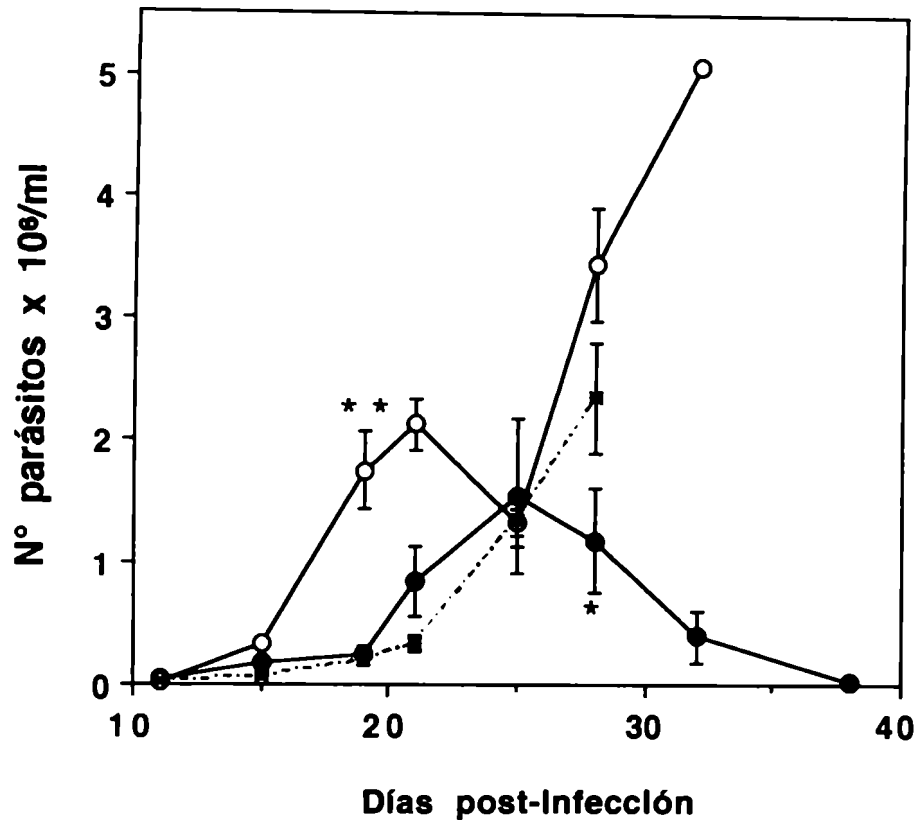


Figura 32: Niveles de parasitemia de animales inmunizados con FT y matrix (●), FF y matrix (○) y de controles no inmunizados (-) después de un desafío parasitario. Ratones BALB/c fueron inmunizados con 3 dosis de 10 μ g de cada preparación con intervalos de 5 y 4 semanas. Los animales se desafiaron con 1000 tripomastigotes metacíclicos 30 días después de la última dosis. Cada punto representa el promedio de las parasitemias de ocho ratones \pm E.E hasta el día 18 post-infección, y de los ratones sobrevivientes desde este punto en adelante. ** $p < 0.005$ entre FT/m y FF/m, * $p < 0.05$ entre FT/m y control.

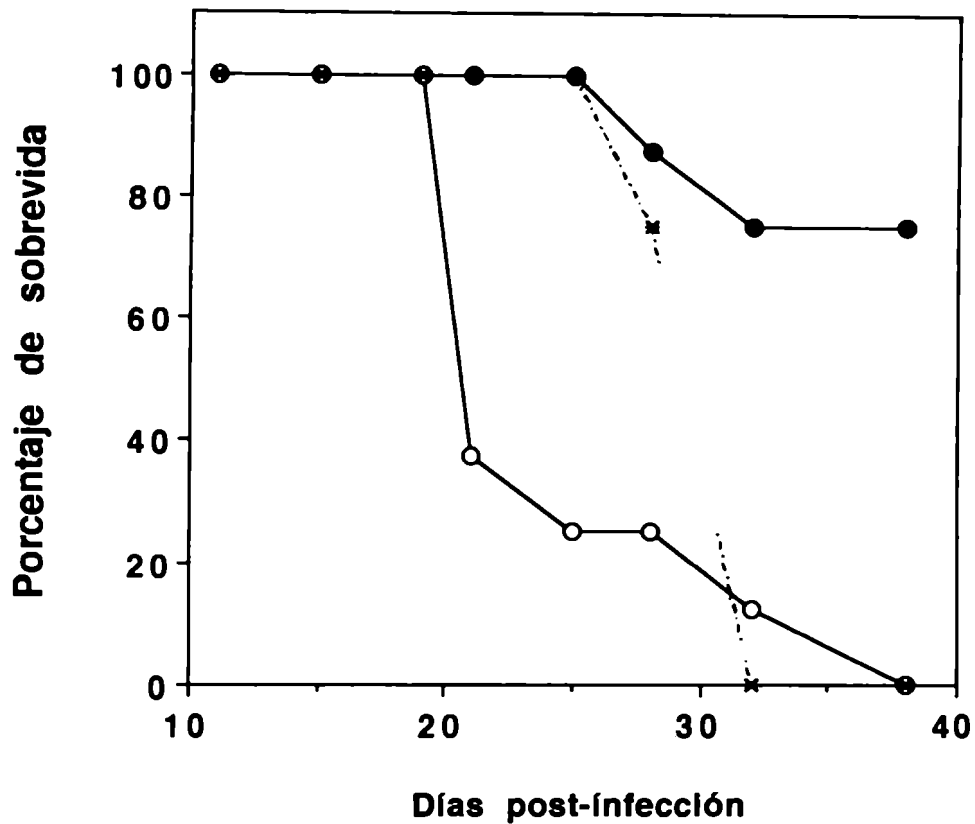


Figura 33: Porcentaje de supervivencia después de un desafío parasitario de ratones BALB/c inmunizados con 3 dosis de 10 μ g de FT y matrix (●), FF y matrix (○) y de controles no inmunizados (-). Las inmunizaciones se efectuaron con intervalos de 5 y 4 semanas. Los animales ($n = 8$) se desafiaron con 1000 tripomastigotes metacíclicos 30 días después de la última dosis.

Discusión

4. DISCUSION

La inmunogenicidad de las proteínas de membrana puede ser aumentada en gran medida mediante su incorporación a complejos inmunoestimulantes (Morein *et al.*, 1984). En el presente estudio, las proteínas de la fracción flagelar del *Trypanosoma cruzi* fueron incorporadas eficientemente en ISCOMS. El análisis en geles de poliacrilamida y por Western blot con sueros de animales inmunizados y crónicamente infectados mostró que la composición de proteínas de los FF-ISCOMS es similar a la de la FF inicial, indicando que el proceso de incorporación a ISCOMS preservó en gran medida la estructura de los determinantes antigénicos.

Después de la administración de dos dosis a ratones BALB/c, los FF-ISCOMS indujeron una respuesta de anticuerpos significativamente mayor que la FF sola. Cabe señalar, que la revacunación con una segunda dosis de FF sola no provocó un aumento significativo de la respuesta de anticuerpos comparado con el inducido después de la primera inmunización. Este hecho podría deberse a la falta de desarrollo de linfocitos B de memoria o bien a un estado de inmunosupresión en los ratones inmunizados con FF en ausencia de adyuvante. La respuesta humoral inducida por los FF-ISCOMS es semejante a que la obtenida inmunizando con una dosis 25 veces mayor de FF adyuvada con *B. pertussis*, administrada semanalmente 5 veces (Ruiz *et al.*, 1986). Este hecho demuestra que la inmunogenicidad de las proteínas de la FF es fuertemente incrementada por su inclusión en ISCOMS.

Los FF-ISCOMS indujeron también una importante respuesta inmune celular, evidenciada en una alta respuesta de hipersensibilidad tardía y en una elevada proliferación celular. Esta última relacionada

con un aumento en la producción de IL-2 observada en cultivos de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con FF-ISCOMS reestimulados *in vitro* con FF. Los niveles de IL-2 en sobrenadantes celulares de animales inmunizados con la FF sola se correlacionan fuertemente con el aumento de la respuesta linfoproliferativa a la estimulación con FF, indicando que el incremento de la producción de IL-2 durante la estimulación es el resultado del incremento en el número de células productoras de IL-2. Por el contrario, en esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con FF-ISCOMS la producción de IL-2 precedió a la proliferación celular. Este hecho indica que la inmunización con FF-ISCOMS induce el desarrollo de células T de memoria capaces de secretar IL-2 al reestimar *in vitro*. Estos resultados concuerdan con experimentos similares realizados con esplenocitos de ratones inmunizados con ISCOMS preparados con proteínas del virus de influenza, en donde los ISCOMS producen niveles mayores de IL-2 que la misma cantidad de proteína administrada en micelas (Villacrés-Eriksson *et al.*, 1992). La IL-2 potencia el desarrollo de respuestas inmunes específicas en modelos experimentales de la enfermedad de Chagas (Choromanski & Kuhn, 1985) y revierte la inducción de respuestas inmunosupresivas causada por el *T. cruzi* (Tarleton & Kuhn, 1984), por lo cual, una vacuna eficiente contra el parásito debería inducir o modular la producción de esta citoquina.

Aunque los FF-ISCOMS indujeron una elevada respuesta inmune humoral y celular, la protección conferida ante un desafío parasitario fue limitada, evidenciada en un retardo en la aparición de la parasitemia y de la mortalidad comparado con los controles no inmunizados y con los animales inmunizados con FF sin adyuvante. Antígenos definidos y/o purificados, como por ejemplo las proteínas

de la envoltura del virus de influenza (Lövgren *et al.*, 1990), gp 360 del virus de Epstein-barr (Morgan *et al.*, 1988) y la proteína G de virus de rabia (Fekadu *et al.*, 1992) inducen protección completa a dosis muy bajas cuando son incluídas en ISCOMS. Además, inmunizaciones con ISCOMS preparados con un antígeno purificado de *T. cruzi* inducen reducción de la parasitemia y de la mortalidad ante un desafío parasitario (Araujo & Morien, 1991). Por el contrario, los ISCOMS utilizados en el presente estudio presentan una composición proteica compleja, semejante a la expuesta la membrana del parásito. Es razonable entonces postular que no todos los antígenos incluídos en los complejos están involucrados en la inducción de una respuesta protectora, y aquellos que son protectivos, podrían estar presentes a una muy baja concentración.

Otra posible explicación a la limitada protección mediada por los FF-ISCOMS sería la presencia de antígenos con efectos supresivos o detrimentales (como el Ag 123), capaces de modular negativamente el desarrollo de una respuesta inmune protectora. En apoyo a esta idea, la sobrevivencia de los ratones inmunizados con 3 dosis de 4 µg de FF en ausencia de sistemas adyuvantes fue 3 veces menor que la de los controles no inmunizados.

Distintos mecanismos supresivos, presumiblemente involucrados en facilitar la diseminación del parásito en el huésped, tienen lugar durante la infección temprana con *T. cruzi*. Entre ellos, podemos citar la secreción de moléculas con actividad supresiva tales como IL-10 (Silva *et al.*, 1992) y TGF-β (Silva *et al.*, 1991). En nuestras condiciones experimentales, ni IL-4 ni IFN-γ pudieron ser detectados en sobrenadantes de esplenocitos de ratones inmunizados con FF o FF-ISCOMS. Se ha descrito que TGF-β inhibe la producción de estas dos citoquinas en células T_{H0} estimuladas *in vitro*

(Holter *et al.*, 1994). En la sección 3.2. de RESULTADOS del presente estudio mostramos que la FF estimula la producción de TGF- β *in vivo*. De ésta manera, el aumento de TGF- β mediado por componentes de la FF explicaría la ausencia de IL-4 e IFN- γ en los sobrenadantes de esplenocitos de animales inmunizados con FF o FF-ISCOMS.

La IL-10, que fue inducida en experimentos de reestimulación con esplenocitos de ratones inmunizados, es una citoquina que al igual que el TGF- β disminuye la producción de IFN- γ (Moore *et al.*, 1990) un factor clave involucrado en la resistencia al parásito (Minoprio *et al.*, 1993, Reed, 1988, Torrico *et al.*, 1991). Es interesante señalar sin embargo, que la FF incorporada en ISCOMS, disminuyó la capacidad de producir IL-10 por los esplenocitos presensibilizados en respuesta a antígenos de la FF. Estos resultados concuerdan con lo observado con antígenos del virus de influenza incluidos en ISCOMS que producen niveles mas bajos de IL-10 que la misma proteína presentada en micelas (Villacres-Eriksson, 1995).

La deficiencia en la inducción de células productoras de IFN- γ por parte de los FF-ISCOMS, posiblemente relacionada a la actividad inhibitoria de citoquinas como la IL-10 y el TGF- β , explicaría la protección limitada ante un desafío parasitario.

Al igual que el estudio de los fenómenos inmunosupresivos, otro aspecto diferente de la respuesta inmune al *T. cruzi* que ha recibido considerable atención ha sido la búsqueda y caracterización de antígenos involucrados en la inducción de inmunidad y protección contra el parásito. En la sección 3.2 del presente estudio se describen propiedades inmunológicas, posiblemente relacionadas con estas respuestas, de dos subfracciones de la fracción flagelar de *T. cruzi*

definidas por inmunoadinidad a un anticuerpo monoclonal anti-FF-ISCAMS. La FF depletada del Ag 123 (FT) mostró ser un potente estimulador de la proliferación de esplenocitos normales e inmunes de ratones BALB/c, mientras que el Ag 123 presentó actividad inmunosupresora *in vitro*, inhibiendo la respuesta linfoproliferativa inducida por FT, así como también aquella estimulada por Con A.

Uno de los desordenes inmunológicos que tienen lugar durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* es una marcada activación policlonal (Ortiz-Ortiz *et al.*, 1980; Minoprio *et al.*, 1986). La estimulación de la linfoproliferación en esplenocitos de ratones no inmunes mediada por el FT se asemeja a esta respuesta. Se ha postulado que el *T. cruzi* y otros protozoos (Piuvezam *et al.*, 1993, Van Voorhis, 1992) contienen o producen componentes similares a los superantígenos reportados en bacterias (Johnson *et al.*, 1991, Johnson *et al.*, 1992), capaces de estimular la proliferación de linfocitos uniéndose directamente a la porción V β del receptor para células T. Con los conocimientos presentes no puede descartarse la presencia de componentes con actividad superantigénica en FT. Es también posible que la proliferación inducida por el FT se deba a una respuesta primaria generada *in vitro*, debido a la presencia de uno o varios componentes altamente inmunogénicos. De manera similar, se ha descrito una respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periféricas humanas (PBMC) provenientes de donantes normales en respuesta a antígenos crudos y definidos de *T. cruzi* (Piuvezam *et al.*, 1993), o al cocultivar PBMC con tripomastigotes de *T. cruzi*. (Van Voorhis, 1992). En ambos reportes, esta respuesta proliferativa, que alcanza un máximo después de 5 a 7 días de estimulación, mostró ser dependiente de células presentadoras de antígeno y de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad,

lo que sugiere la necesidad de una fase de procesamiento de antígeno. Sumado a la respuesta estimuladora primaria, el FT indujo también una potente proliferación en esplenocitos provenientes de animales inmunizados con FF-ISCOMS.

El hecho que FT mostrara una respuesta proliferativa significativamente superior a la inducida por la FF completa sugirió que el Ag 123 prevenía el desarrollo de dicha respuesta. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron la capacidad del Ag 123 de suprimir la respuesta proliferativa mediada por mitógeno (Con A) o antígeno-específica. Aunque el Ag 123 indujo una elevada respuesta de anticuerpos, evidenciada en una gran proporción de anticuerpos monoclonales que reaccionaron con el mismo patrón de bandas en Western blot, su capacidad de inducir proliferación celular fue limitada.

La habilidad del Ag 123 de inhibir la proliferación mediada por mitógeno concuerda con lo observado en otros trabajos en donde sobrenadantes de suspensiones de tripomastigotes sanguíneos (TIF) suprimen la respuesta proliferativa inducida por fitohemaglutinina (Mejía Lopez *et al.*, 1993, Kierszenbaum *et al.*, 1994.). El Ag 123 fue también capaz de suprimir la respuesta proliferativa mediada por FT en esplenocitos de ratones normales e inmunes, pero no modificó *per se* la proliferación celular en esplenocitos no inmunes. Sin embargo, evocó una baja pero significativa proliferación en células de animales inmunizados. Esta respuesta fue varias veces menor que la inducida por FF o FT, indicando que el Ag 123 podría prevenir la respuesta inmune contra sus propios epitopes o bien que no contiene epitopes inmunogénicos para inducir una adecuada respuesta inmune celular.

TGF- β es una molécula multifuncional con actividades tanto estimuladoras, como inmunosupresivas. Esta citoquina, involucrada en

la inhibición de la proliferación celular (Roberts & Sporn, 1990) es producida también durante la infección aguda con *T. cruzi*, inhibiendo los efectos protectivos mediados por IFN- γ (Silva *et al.*, 1991).. En el presente trabajo la producción de TGF- β ha sido detectada directamente en sueros de ratones tratados con FF o Ag 123, o en sobrenadantes de esplenocitos estimulados con Ag 123. *In vitro*, FF no evocó secreción de TGF- β lo cual concuerda con la observación de que el Ag 123 pero no la FF suprimen la proliferación de linfocitos. Mas aún, el efecto supresivo del Ag 123 sobre la proliferación inducida por Con A fue neutralizado por la adición de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- β lo cual confirma que la actividad supresiva del Ag 123 es mediada al menos en parte por un mecanismo dependiente de TGF- β . Además, la reversibilidad de la supresión observada con la adición del anticuerpo anti-TGF- β confirma que el efecto inhibitorio del Ag 123 no se debe a citotoxicidad, sino que realmente se trata de una respuesta supresiva.

Recientemente se describió, que la activación de la cascada de señalización intracelular inducida por la activación de receptores para TGF- β es un requisito para la invasión del *T. cruzi* en células epiteliales (Ming *et al.*, 1995). En ese reporte, tanto tripomastigotes como sus productos de secreción pero no epimastigotes ni sus productos de secreción, estimularon la producción de TGF- β . El Ag 123, un potente estimulador de TGF- β , ha sido purificado a partir de fracciones provenientes de epimastigotes. Esta discrepancia podría deberse a la inhabilidad de los epimastigotes no infectivos en secretar o liberar al medio estos inductores de TGF- β *in vitro*. Componentes del Ag 123 han sido encontrados también en tripomastigotes (datos no mostrados), sin embargo se necesitan estudios mas profundos para

clarificar si este estadio del parásito es capaz de secretar moléculas del Ag 123.

La secuenciación de péptidos provenientes de las proteínas de 36 y 38 kDa presentes en el Ag 123 mostró que éstos presentan homología con las alfa-fetoproteínas humana y de rata. El hecho que el perfil de péptidos obtenido después de la digestión de las bandas proteicas de 36 y 38 kDa coincidan completamente indica que ambas bandas corresponden a una misma molécula. Para comenzar con la caracterización bioquímica y molecular del Ag 123 se escogieron las bandas de 36 y 38 kDa ya que fueron completamente removidas del FT por la cromatografía de afinidad. Estudios posteriores clarificarán el grado de homología entre esta molécula y las otras proteínas presentes en el Ag 123. El origen de una proteína mostrando homología con proteínas del huésped es discutible, sin embargo la inmunoprecipitación de la proteína de 38 kDa a partir de un lisado de epimastigotes metabólicamente marcado con [³⁵S]-metionina indica que este polipéptido es un componente del parásito, y no un contaminante proveniente de medios de cultivo durante la preparación de la FF o la purificación de los antígenos. Además, en estudios de Western blot el anticuerpo TC2C123 no presentó reactividad alguna con 100 µg de proteína de suero fetal bovino o de medio de cultivo usado para el crecimiento de los epimastigotes (datos no mostrados). Mas aún, un anticuerpo anti-AFP humana mostró reactividad cruzada con las proteínas de 58, 38 y 36 kDa presentes en el Ag 123. Actualmente, se están realizando estudios más profundos a nivel molecular para confirmar la presencia de este antígeno en el genoma del parásito.

La alfa-fetoproteína es una glicoproteína de 65 kDa, altamente conservada en mamíferos, que ha sido detectada bajo dos condiciones.

Por un lado es un marcador tumoral, y en algunos casos se ha reportado que sinergiza el efecto de algunos factores de crecimiento (Keel *et al.*, 1991). Por otro lado, esta proteína que está presente en líquido amniótico principalmente durante el primer trimestre del embarazo, parece ser una de las moléculas responsables de la inmunosupresión que tiene lugar para prevenir el rechazo del feto por el medio materno (Murgita, 1976, Chakraborty & Mandal, 1993). Las propiedades supresivas de las alfa-fetoproteínas han sido observadas en distintas condiciones (Cohen *et al.*, 1986; O' Neil *et al.*, 1982; Chakraborty & Mandal, 1993). Sin embargo no se conoce hasta la fecha su mecanismo de acción. Se ha descrito la presencia de receptores para AFP en células monocíticas (Susuki *et al.*, 1992) o linfocitos bajo transformación blástica (Torres *et al.*, 1989). Altman *et al.* (1990), describieron que la AFP humana interactúa con TGF- β en líquido amniótico. Estos autores postulan que AFP se une al TGF- β actuando como molécula transportadora para la citoquina. Con los datos mostrados en el presente trabajo no puede inferirse si el Ag 123 utiliza también este mecanismo, aunque la presencia simultánea de péptidos con homología con AFP y la actividad estimuladora de TGF- β en el mismo antígeno alientan esta hipótesis.

Resumiendo lo hasta aquí expuesto, el subfraccionamiento de la FF por inmunoadfinidad a un anticuerpo monoclonal anti-FF-ISCOMS permitió el análisis de las propiedades inmunológicas de diferentes componentes de la misma, revelando la presencia en el *T. cruzi* de componentes capaces de mediar respuestas inmunológicas opuestas. La capacidad de inducir una elevada respuesta inmune del FT, abrió la posibilidad de su aplicación en experimentos orientados hacia la obtención de una respuesta inmune protectora contra el parásito. Por su parte, la actividad inmunosupresora del Ag 123, que estaría

mediada al menos en parte por TGF- β , sugiere que éste antígeno podría ser una de las moléculas responsables de la profunda inmunosupresión que tiene lugar durante estadíos tempranos de la infección con *Trypanosoma cruzi*. La posible homología entre una proteína del parásito con componentes supresivos altamente conservados, presentes en los mamíferos describe un nuevo mecanismo evolutivo generado por el parásito para eludir la respuesta inmune montada por el huésped.

En la tercera parte de la sección RESULTADOS del presente estudio se comparó el efecto de inmunizaciones con la FF y la FF depletada del antígeno inmunosupresor 123 (FT) en la capacidad de inducir respuestas inmunológicas y protección ante un desafío parasitario. Este trabajo demuestra que el FT es un poderoso estimulador de respuestas inmunes humoral y celular, incluyendo producción de anticuerpos, activación de macrófagos, proliferación celular, secreción de citoquinas y protección de animales inmunizados ante un desafío parasitario.

Aunque los títulos de anticuerpos totales encontrados en sueros de animales inmunizados con FF adyuvada con matrix (FF/m) y FT adyuvada con matrix (FT/m) coincidieron a lo largo de un período de 3 inmunizaciones, la calidad de los mismos se diferencia en cada caso. La detección de un mayor número de bandas proteicas sobre un lisado de parásito en inmunoblot con los sueros de los animales inmunizados con FT/m en comparación con aquellos de animales que recibieron FF/m sugiere la presencia de componentes en la FF capaces de inmunodominar la respuesta de anticuerpos o bien de inhibir la reactividad hacia otros antígenos del parásito. En apoyo a estos datos, se observó que una gran proporción de anticuerpos monoclonales anti-

FF-ISCOMS reconocieron el patrón de bandas correspondiente al Ag 123 en estudios de Western blot. De manera similar, epitopes inmunodominantes presentes en la región carboxilo-terminal del antígeno de superficie 1 de tripomastigotes (TSA-1) enmascaran epitopes presentes en la región amino-terminal de esta molécula capaces de inducir inmunidad contra el parásito (Wrightsmann *et al.*, 1994).

El perfil de isotipos de los anticuerpos anti-FT/m mostró algunas diferencias con el observado en anticuerpos anti-FF/m. Después de la primera dosis antigénica, los animales inmunizados con FT/m desarrollaron más rápidamente anticuerpos IgG₁ que los animales inmunizados con FF/m. Simultáneamente, los títulos de anticuerpos IgM disminuyeron antes en los sueros de ratones inmunizados con FT/m con respecto a los de animales inmunizados con FF/m. Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren que la inmunización con FT/m induce un cambio isotípico más temprano que la inmunización con FF/m, estimulando la diferenciación de linfocitos B y promoviendo la secreción de IgG₁. Este efecto es probablemente mediado por las citoquinas estimuladas por FT/m. Entre ellas, IL-4 estimula la producción de IgG₁ (Snapper & Paul, 1987) y los niveles de esta citoquina fueron mayores en animales inmunizados con FT/m que en aquellos inyectados con FF/m.

Después de las revacunaciones, el isotipo mas abundante tanto en animales inmunizados con FF/m como con FT/m fue IgG₁. Sin embargo, los animales inmunizados con FF/m produjeron también anticuerpos IgG₃, mientras que aquellos tratados con FT/m presentaron significativos niveles de IgG_{2a}, lo cual se debe probablemente a la inducción de IFN- γ mediada por el FT (ver más adelante). IFN- γ tiene un papel importante en la regulación de isotipos

de inmunoglobulinas, y en especial en el desarrollo de IgG_{2a} (Finkelman *et al.*, 1988). Numerosos estudios indican que tanto el isotipo IgG₁ como el IgG_{2a} de anticuerpos específicos contra el *T. cruzi*, están involucrados en la inducción de inmunidad protectora contra el parásito (Gea *et al.*, 1992, Stefani *et al.*, 1983, Plumas *et al.*, 1993).

El FT ha mostrado ser un poderoso activador de macrófagos *in vitro*, estimulando activamente la producción de IL-1 e IL-6. Estas citoquinas, producidas principalmente por células presentadoras de antígeno, juegan un papel fundamental en la iniciación de la respuesta inmune, ya que ambas son necesarias durante la activación inicial de los linfocitos T (Holsti & Raulet, 1989, Stein & Singer, 1992). Mientras IL-1 induce su proliferación (Kaye *et al.*, 1984) y secreción de citoquinas (Stein & Singer, 1992), IL-6 estimula también su diferenciación. Estas citoquinas estimulan también la diferenciación y proliferación de linfocitos B (Jelinek & Lipsky, 1987) y la actividad de células NK (Oppenheim *et al.*, 1986). Es interesante observar que la FF completa no estimuló la producción de IL-1 ni de IL-6, considerando que esta fracción subcelular contiene componentes de membranas del parásito que generalmente tienden a formar agregados moleculares. Los antígenos particulados son internalizados más eficientemente por los macrófagos, los cuales tienen un papel clave en el desarrollo de la respuesta inmune debido a su notoria capacidad de producir una amplia gama de citoquinas, incluyendo TGF- β . Estudios recientes mostraron que la depleción de macrófagos esplénicos *in vivo* impide la producción de IFN- γ y el desarrollo de anticuerpos IgG_{2a} (Brewer *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha reportado la presencia de poblaciones de macrófagos supresivos en bazo de ratones infectados con *T. cruzi*. Una de estas poblaciones suprime tanto respuestas

específicas primarias como mitogénicas, mientras la otra es capaz de suprimir la respuesta de linfocitos T activados mediante la inhibición de la producción de IL-2 (Cerrone & Kuhn, 1991). Es posible entonces postular que el Ag 123 presente en la FF estimule preferencialmente poblaciones de macrófagos que producen TGF- β pero no IL-1 ni IL-6.

Las inmunizaciones con FT/m indujeron una prominente activación de la respuesta inmune celular, evidenciada por un marcado estado de estimulación *in vivo* que provocó la proliferación celular de los esplenocitos sensibilizados y la secreción de citoquinas en ausencia de una reestimulación *in vitro*. En contraste, inmunizaciones con la FF completa adyuvada con matrix indujeron respuestas celulares significativamente menores.

Los esplenocitos de animales inmunizados con FF/m secretaron *in vitro* elevados niveles de IL-2, IL-10 e IL-4 en respuesta a la FF completa, pero los niveles fueron más bajos cuando se reestimularon con FT. Este hecho sugiere que componentes presentes en la FF y ausentes en el FT produjeron durante las inmunizaciones el desarrollo de células de memoria capaces de secretar estas citoquinas.

En los esplenocitos de animales inmunizados con FT/m, los niveles de IL-2, IL-4 e IL-10 también fueron superiores al reestimar *in vitro* con FF que con FT. En estos estudios se encontró que el FT es un potente estimulador de IFN- γ . Es posible especular que el FT, a través de un aumento en la producción de IFN- γ , estimule preferencialmente linfocitos del grupo T_{H1}, disminuyendo en consecuencia la actividad de los linfocitos T_{H2}.

A diferencia de lo observado al inmunizar ratones con FF/m, la FF en ausencia de adyuvantes o incluida en ISCOMS no estimula el

desarrollo de esplenocitos productores de IL-4. Las razones de esta diferencia pueden ser varias. En primer lugar, es posible que los ratones inmunizados con matrix recibieron comparativamente más adyuvante que los ratones inmunizados con ISCOMS. En segundo lugar, es posible que la composición antigénica de FF-ISCOMS y FF/m no sea idéntica, ya que proteínas con secuencias hidrofóbicas son incorporadas preferencialmente a los ISCOMS, lo cual implica que ciertas proteínas, según su naturaleza, se encuentran en proporción mas alta o mas baja en los ISCOMS. En tercer lugar, la internalización y la presentación de antígenos en ISCOMS o matrix son diferentes. En ISCOMS, el antígeno y el adyuvante se encuentran en la misma partícula, lo que favorece la internalización y secreción de citoquinas. La adición de matrix aunque no influye en la internalización del antígeno, estimula la producción de citoquinas las cuales aumentan el nivel de respuesta inmune de una manera generalizada.

En células provenientes de ratones inmunizados con FT/m se observó una producción espontánea de las 4 citoquinas ensayadas. Los niveles de IL-2, IL-10 e IL-4 detectados en condiciones control fueron iguales o superiores a aquellos encontrados al estimular *in vitro* tanto con FF como con FT. Posiblemente, el alto nivel de activación *in vivo* de los linfocitos de animales inmunizados con FT/m no permite un incremento adicional de la respuesta, y la presencia de antígeno en los cultivos resulta en niveles menores de citoquinas debido a mecanismos retroactivos de control. En contraste, aunque se observa una secreción espontánea de IFN- γ , la producción de esta citoquina aumenta significativamente cuando los esplenocitos de animales inmunizados con FT/m, se reestiman *in vitro* con FT o con FF. Estas observaciones demuestran claramente que la inmunización con FT/m, además de un importante estado de activación espontánea o

inespecífica, indujo el desarrollo de células de memoria productoras de IFN- γ capaces de secretar esta citoquina al reestimar *in vitro*. FT estimuló *in vitro* la secreción de IFN- γ , aún en esplenocitos de animales inmunizados con FF/m. Esta respuesta tal vez no requiera la estimulación de células de memoria sino más bien sea iniciada *de novo in vitro* por componentes presentes en el FT, dado que estas células responden sólo pobremente al estímulo con FF cuando se evalúa la secreción de IFN- γ . Otra atrayente explicación para este fenómeno, sería la presencia entre los esplenocitos de animales inmunizados con la FF/matrix de células capaces de secretar factores inhibitorios, tales como el TGF- β , en respuesta a componentes presentes en FF y ausentes en FT (como el Ag 123) que suprimieran la secreción de IFN- γ en respuesta al estímulo. En apoyo a esta idea se destaca el hallazgo de que el Ag 123 es un potente estimulador de TGF- β tanto *in vivo* como *in vitro*.

Sumado a una prominente activación de la respuesta inmune, dosis tan bajas como 10 μ g de proteínas de FT adyuvadas con matrix de ISCOMS fueron suficientes para inducir un remarcable nivel de protección ante un desafío con tripomastigotes metacíclicos, evidenciado en reducción de la parasitemia y un 75 % de sobrevivencia de los animales inmunizados. Esta protección mediada por FT/m se debe presumiblemente a su capacidad de evocar elevados niveles de IFN- γ , citoquina clave en la inducción de resistencia al *T. cruzi* (Minoprio *et al.*, 1993, Reed, 1988, Torrico *et al.*, 1991).

Datos presentados en la sección 3.2 mostraron que el FT estimula espontáneamente la proliferación de esplenocitos no inmunes *in vitro*. Respuestas semejantes han sido observadas también *in vivo* (Sección 3.3) dado que células de animales inmunizados con FT/m proliferan y secretan citoquinas espontáneamente al ser cultivadas en

ausencia de estímulos. De manera similar, se ha descrito la producción de IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IFN- γ , y TNF- α al cocultivar PBMC humanas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Van Voorhis, 1992), y la producción de IL-2 al estimular PBMC con antígenos crudos del parásito (Piuvezam *et al.*, 1993). La naturaleza de este tipo de respuestas y sus implicaciones en relación a la infección con *T. cruzi* no han sido esclarecidas por completo hasta el presente. Generalmente, se postula que respuestas tales como activación policlonal (Minoprio *et al.*, 1986) o aquellas mediadas por superantígenos (Johnson *et al.*, 1992) están involucradas en la inducción de desórdenes inmunológicos y en la patología de los procesos infectivos. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que una misma preparación subcelular induce este tipo de respuestas y a la vez confiere protección a los animales inmunizados. Con la información disponible hasta el presente no es posible concluir si ambos fenómenos son causados por una respuesta de la misma naturaleza. Además, el FT está compuesto por una mezcla de proteínas del *T. cruzi*. Estudios futuros esclarecerán si los componentes involucrados en la inducción de IFN- γ y protección son los mismos que aquellos responsables de la activación inespecífica. Otra situación semejante ha sido descrita por Pestel *et al.* (1992) usando un péptido de 18 aminoácidos proveniente de la proteína de superficie de 85 Kd de tripomastigotes que es capaz de inducir protección parcial ante un desafío parasitario (Ouaissi *et al.*, 1989) y activación policlonal (Pestel *et al.*, 1992). Se han descrito algunas moléculas con actividad superantigénica que mostraron también capacidad protectora. Tal es el caso de la proteína M de *Streptococci equi* que confiere protección parcial en animales contra faringitis bacteriana (Groux *et al.*, 1991), o la toxina pertussis y una proteína

derivada de *Micobacterium tuberculosis* que protegen a ratones contra la encefalomiелitis experimental autoinmune (Ben-Nun *et al.*, 1993).

En resumen, la FF incluida en ISCOMS, adyuvada con matrix o en ausencia de sistemas adyuvantes, indujo el desarrollo una respuesta inmune humoral y celular caracterizada por la presencia de células de memoria capaces de segregar IL-2, IL-10 e IL-4, esta última sólo bajo una condición experimental. Este tipo de respuesta, no protege a ratones inmunizados ante un desafío parasitario. La separación cromatográfica de la FF permitió la identificación del Ag 123 con actividad inmunosupresiva a través de un mecanismo dependiente de TGF- β . La remoción de este antígeno de la FF dio como resultado una subfracción celular, el FT, capaz de provocar una prominente activación del sistema inmune, incluyendo proliferación y secreción espontánea de citoquinas liberadas por células T_{H1} (IL-2 e IFN- γ) y T_{H2} (IL-4 e IL-10) y protección de ratones ante un desafío parasitario. Los patrones de citoquinas descritos en el presente estudio hacen difícil enmarcar estas respuestas en la clasificación T_{H1}/T_{H2}. Trabajos anteriores señalan que ratones infectados con *T. cruzi* ya sea sensibles o resistentes al parásito tampoco muestran un patrón de expresión de genes estándar para citoquinas de células T_{H1} o T_{H2} (Minoprio *et al.*, 1993). Estas evidencias en conjunto parecerían indicar que la respuesta inmune al *T. cruzi* es mas compleja que en otras infecciones, como por ejemplo leishmaniasis (Miralles *et al.*, 1994), en donde las respuesta T_{H1} y T_{H2} están polarizadamente asociadas con resistencia y susceptibilidad, respectivamente. La posibilidad de subpoblaciones intermedias entre T_{H1} y T_{H2} no puede excluirse (Wong *et al.*, 1988). De todos modos, en nuestras condiciones experimentales podemos postular que la presencia del Ag 123 en la FF previene el desarrollo de células de memoria productoras de IFN- γ a través de un mecanismo

dependiente de TGF- β en los animales inmunizados. Se ha descrito que esta citoquina inhibe la secreción de IFN- γ e IL-4 en células T_{H0} (Holter *et al.*, 1994) y suprime la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ en células T_{H1}, productoras de IFN- γ (Schmitt *et al.*, 1994). La ausencia del Ag 123 en el FT permite consecuentemente el desarrollo de estas respuestas confiriendo un remarcable nivel de protección contra la infección con el protozoo *T. cruzi*.

Bibliografía

5. BIBLIOGRAFIA

Acosta, A. M., Sadigurski, M. & Santos-Buch, C. A. 1983. Anti-sriated-muscle antibody produced by *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y)* **172**: 364.

Allison, A. C. & Gregoriadis, G. 1974. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*. **252**: 252.

Altman, D.J., Schneider, S. L., Thompson, D. A., Cheng, H. L. & Tomasi, T. B. 1990. A transforming growth factor beta 2 (TGF-beta-2)-like immunosuppressive factor in amniotic fluid and localization of TGF-beta-2 mRNA in pregnant uterus. *J. Exp. Med.* **172**: 1391.

Alves, M. J. M. 1986. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**: 175.

Andrade, Z. A. 1991. Pathogenesis of Chagas' disease. *Res. Immunol.* **142**: 126.

Andrews, N. W., Alves, M. J., Schumacher, R. I. & Colli, W. 1985. *Trypanosoma cruzi*: protection in mice immunized with 8-methoxypsoralen- inactivated trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* **60**: 255.

Andrews, N. W., Abrams, C. K., Slatin, S. L. & Griffiths, G. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement

component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell*. **61**: 1277.

Araujo, F. G. 1984. Resistance to *Trypanosoma cruzi* induced by immunization with antigens isolated by affinity chromatography. *Braz J. Med. Biol. Res.* **17**: 157.

Araujo, F. G. 1989. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes. *Infect Immun.* **57**: 2246.

Araujo, F. & Morein, B. 1991. Immunization with *Trypanosoma cruzi* epimastigote Antigens incorporated into iscoms protects against lethal challenge in mice. *Infect Immun.* **59**: 2909.

Bahr, G. M., Caelli, C., Audibert, F., Modabber, F. & Chedid, L. 1982. Analysis of the antigenic relationship of various derivatives of N-acetyl-muramyl-L-ala-D-isoglutamine (MDP), using anti-MDP antibodies. *Mol. Immunol.* **19**: 737.

Ben Youne-Chennoufi, A., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Tricottet, V., Eisen, H., Reynes, M. & Said, G. 1988. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**: 77.

Ben-Nun. A., Yossefi, S. & Lehmann, D. 1993. Protection against autoimmune disease by bacterial agents. II. PPD and pertussis toxin as proteins active in protecting mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **23**: 689.

Bergström, M. M., Loövgren, K., Åkerblom, L., Fossum, C. & Morein, B. 1992. Antigen-specific increases in the number of splenocytes expressing MHC class II molecules following restimulation with antigen in various physical forms. *Scand. J. Immunol.* **36**: 565.

Blagowchensky, N. N. 1938. Durée de séjour de l'antigène dans l'organisme et immunité. *Rev. Immunol. Paris* **4**: 161.

Bomford, R. 1980. The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. *Clin. Exp. Immunol.* **39**: 426.

Bonet A. H. 1972. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Simp. Intern. Enfermedad de Chagas.* p 163, Buenos Aires Argentina.

Bosco, M. C., Espinoza, D. I., Schwabe, M., Russell, S. M., Leonard, W. J., Longo, D. L. & Varesio, L. 1994. The gamma subunit of the interleukin-2 receptor is expressed in human monocytes and modulated by interleukin-2, interferon gamma, and transforming growth factor beta I. *Blood.* **83**: 3462.

Brener, Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **4**: 389.

Brener, Z. & Andrade, Z. A. 1979. Patología. En: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* Andrade, Z. A & Andrade, S. G. Ed. pp. 199.

Brewer, J. M., Richmond, J. & Alexander, J. 1994. The demonstration of an essential role for macrophages in the in vivo generation of IgG_{2a} antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **97**: 164.

Camargo, I. J., Araujo, P. M., Sakurada, J. K., Stach, M. D. & Rangel, H. A. 1991. *Trypanosoma cruzi*: early resistance induced by culture-derived trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* **73**: 26.

Cerisola, J. A., Rabinovich, A., Alvarez, M., di Corletto, C. H. & Pruneda, J. 1972. Enfermedad de Chagas y transfusión de sangre. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **73**: 203.

Cerrone, M. C. & Kuhn, R. 1991. Macrophage regulation of immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi*, *Cell. Immunol.* **138**: 423.

Chakraborty, M. & Mandal, C. 1993. Immuno-suppressive effect of human alpha-fetoprotein: a cross species study. *Immunol. Invest* **22**: 329.

Chedid, L. A., Parant, M. A., Audibert, F. M., Riveau, G. J., Parant, F. J., Lederer, E., Choay, J. P. & Lefrancier, P. L. 1982. Biological activity of a new synthetic muramyl peptide adjuvant devoid of pyrogenicity. *Inect. Immun.* **35**: 417.

Choromanski, L. & Kuhn, R. 1985. Interleukin 2 enhances specific and nonspecific immune responses in experimental Chagas' disease. *Infec. Immun.* **50**: 354.

Clinton, B. A., Ortiz-Ortiz, L., García, W., Martinez, T. & Capin, R. 1975. *Trypanosoma cruzi*: early immune responses in infected mice, *Exp. Parasitol.* **37**: 417.

Cohen, B.L., Orn, A. Gronvik, K. O., Gidlund, M., Wigzell, H. and Murgita, R. A. 1986. Suppression by alpha-fetoprotein of murine natural killer cell activity stimulated *in vitro* and *in vivo* by interferon and interleukin-2. *Scand. J. Immunol.* **23**: 211.

Corsini, A. C., Costa, M. G., Oliveira, O. L. P., Camargo, I. J. B. & Rangel, H. A. 1980. A fraction (FAd) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes depresses the immune response in mice. *Immunol.* **40**: 505.

Cossio, P. M., Diez, C., Szarfman, A., Kreutzer, E., Candiolo, B. & Arana, R. M. 1974. Chagasic cariopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which binds with endocardium and vascular structures. *Circulation.* **49**: 13.

Cunningham, D., Kuhn, R. & Rowland, E. C. 1978. Suppression of humoral responses during *Trypanosoma cruzi* infections in mice *Infec. Immun.* **22**: 155.

Cunningham, D., Grogl, M. & Kuhn, R. 1980. Suppression of antibody responses in humans infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infec. Immun.* **30**: 496.

Czarniecki, C. W., Chiu, H. H., Wong, G. W. H., McCabe, S. M. & Palladino, M. A. 1988. Transforming growth factor β 1 modulates the

expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J. Immunol.* **140**: 4217.

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 *T. cruzi*. *Eur. J. Immunol.* **15**: 201.

Dal Monte, P. & Szoka, R. C. 1989. Effect of liposome encapsulation on antigen presentation in vitro. *J. Immunol.* **142**: 1437.

Dalsgaard, K. 1970. Thin layer chromatography fingerprint of commercially available saponins. *Dansk. Tidskr. Farm.* **44**: 327.

Dalsgaard, K. 1974. Saponin adjuvants. *Ach. Gesamte. Virusforsch.* **44**: 243.

Damais, C., Parant, M., Chedid, L., Lefrancier, P. & Choay, J. 1978. In vitro spleen cell responsiveness to various analogs of MDP (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) a synthetic immunoadjuvant, in MDP high responder mice. *Cell. Immunol.* **35**: 173.

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.

de Vries, P., van Binnendijk, R. S., van der Marel, P., van Wezel, A. L., Woorma, H. O., Sinqvist, B., Uytdehaag, F., & Osterhaus, A. 1988. Measles virus fusion protein presented in immune-stimulating

complex (iscom) induces haemolysis-inhibiting and fusion-inhibiting antibodies, virus-specific T cells and protection in mice. *J. Gen. Virol.* **69**: 549.

Ding, A., Nathan, C. F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr., J. & Srimal, S. 1990. Macrophage deactivating factor and Transforming growth factors β 1, β 2 an β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *J. Immunol.* **145**: 940.

Dohlsten, M., Hedlund, G.&Kalland, T. 1991. Staphylococcal-enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today.* **12**: 147.

Ellouz, F., Adam, A., Ciobaru, R. & Ledere, E. 1974. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**: 1317.

Fekadu, M., Shaddock, J. H., Ekstrom, J., Osterhaus, A., Sanderlin, D.W., Sundquist, B. & Morein, B. 1992. An immune stimulating complex (ISCOM) subunit rabies vaccine protects dogs and mice against street rabies challenge. *Vaccine.***10**: 192.

Finkelman, F. D., Katona, I. M., Mosmann, T. R. & Coffman, R. L, 1988. IFN- γ regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* **140**: 1022.

Fohlman, J., Pauksen, K., Morein, B., Bjare, U., Ilback, N. G. & Friman, G. 1993. High yield production of an inactivated coxsackie B3

adjuvant vaccine with protective effect against experimental myocarditis. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.)*

Fossum, C., Bergstrom, M., Lovgren, K., Watson, D. L. & Morein, B. 1990. Effect of iscoms and their adjuvant moiety (matrix) on the initial proliferation and IL-2 responses: comparison of spleen cells from mice inoculated with iscoms and/or matrix. *Cell Immunol.* **129**: 414.

Fox, F. E., Capocasale, R. J., Ford, H. C., Lamb, R. J., Moore, J. S. & Nowell, P. C. 1992. Transforming growth factor-beta inhibits human T-cell proliferation through multiple targets. *Lymphokine Cytokine Res.* **11**: 299.

Fox, F. E., Ford, H. C., Douglas, R., Cherian, S. & Nowell, P. C. 1993. Evidence that TGF-beta can inhibit human T-lymphocyte proliferation through paracrine and autocrine mechanisms. *Cell Immunol.* **150**: 45.

Gazzinelli, R. T., Pereira, M. E., Romanha, A., Gazzinelli, G. & Brener, Z. 1991. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunol.* **13**: 345.

Gea, S., Gruppi, A., Cerban, F., Pistoressi, P. M. & Vottero, C. E. 1992. Immune response in mice immunized with acidic antigenic fractions from *Trypanosoma cruzi* cytosol. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **34**: 389.

Gregoriadis, G. 1990. Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today.* **11**: 89.

Groux, H., Monte, D., Bourrez, J. M., Capron, A. & Ameisen, J. C. 1991. Activation of CD4+ T-lymphocytes in asymptomatic HIV infected patients induce the program action of lymphocyte death by apoptosis. *C. R. Acad. Sci. Iii.* **312**: 599.

Hall, B. F. 1993. *Trypanosoma cruzi*: mechanisms for entry into host cells. *Semin .Cell. Biol.* **4**: 323.

Harth, G., Mills, A. A., Lin, T. & Araujo, F. G. 1994. *Trypanosoma cruzi* glycoprotein of M(r) 56,000 characterization and assessment of its potential to protect against fatal parasite infections. *Mo. Microbiol.* **11**: 261.

Heath, A. W. & Playfair, J. H. L. 1992. Cytokines as immunological adjuvants. *Vaccine.* **10**: 427.

Heeg, K., Kuon, W. & Wagner, H. 1991. Vaccination of class I major histocompatibility complex (MHC)-restricted murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes towards soluble antigens: immunostimulating-ovalbumin complexes enter the class I MHC-restricted antigen pathway and allow sensitization against the immunodominant peptide. *Eur. J. Immuno.* **21**: 1523.

Hellman, U., Wernstedt., C., Góñez, J. & Heldin, C-H. 1995. Improvement of an "in -gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* **224**: 451.

Herzenberg, L. A., Stall, A. M., Lalor, P. A., Sidman, C., Moore, W. A., Parks, D. R. & Herzenberg L. A. 1986. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol. Rev.* **93**: 81.

Higuchi, R., Todimitsu, Y. & Komori, T. 1988. An acylated triterpenoid saponin from *Quillaja saponaria*. *Phytochem.* **24**: 1165.

Hoft, D. F., Lynch, R. G. & Kirchhoff, L. V. 1993. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **151**: 7038.

Holsti, M.A. & Raulat, D. H. 1989. IL-6 and IL-1 synergize to stimulate IL-2 production and proliferation of peripheral T cell. *J. Immunol.* **143**: 2514.

Holter, W., Kalthoff, F.S., Pickl, W.F., Ebner, C., Majdic, O., Kraft, D. & Knapp, W. 1994. Transforming growth factor-beta inhibits IL-4 and IFN-gamma production by stimulated human T cells. *Int. Immunol.* **6**: 469.

Hontebeyrie, J. M. 1991. Murine *Trypanosoma cruzi* infection: a role for TH2 cells in the immunopathology of chronic infection. *Res. Immunol.* **142**: 141.

Hughes, H. P. A. 1988. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitol. Today.* **4**: 340.

Jelinek, D. F. & Lipsky, P. E. 1987. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor- α and interleukin 1. *J. Immunol.* **139**: 2970.

Jensen, O. M. & Koch, C., 1988. On the effect of Al(OH)₃ as an immunological adjuvant. *APMIS.* **96**: 257.

Johnson, H.M., J.K. Russell & C.H. Pontzer. 1991. Staphylococcal enterotoxin superantigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **198**: 765.

Johnson, H. M., Russell, J. K. & Pontzer, C. H. 1992. Superantigens in human disease. *Sci. Am.* **266**: 92.

Kaye, J., Gillis, S., Mizel, S. B., Shevach, E. M, Malek, T. R., Dinarello, C. A., Lachman, L. B. & Janeway, C. A. 1984. Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. *J. Immunol.* **133**: 1339.

Keel, B.A., Eddy, K. B., Cho, S. & May, J.V. 1991. Synergistic action of purified alpha-fetoprotein and growth factors on the proliferation of porcine granulosa cells in monolayer culture. *Endocrinology.* **129**: 217.

Kersten, G. F., Spiekstra, A., Beuvery, E. C. & Crommelin, D. J. 1991. On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscoms). *Biochim . Biophys. Acta.* **1062**: 165.

Kierszenbaum, F., Cuna, W. R., Beltz, L. A. & Sztein, M. B. 1989. *Trypanosoma cruzi* reduces the number of high affinity IL-2 receptors

on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components. *J. Immunol.* **143**: 275.

Kierszenbaum, F. & Sztein, M. B. 1992. *Trypanosoma cruzi* suppresses the expression of p75 chain of interleukin-2 receptor on the surface of activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *Immunology.* **75**: 546.

Kierszenbaum, F., Lopez, H. M. & Sztein, M. B. 1994. Inhibition of *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses by a protein produced by *T. cruzi* in the course of Chagas' disease. *Immunology.* **81**: 462.

Kipnis, T. L., Calich, V.L.G. & Dias da Silva, W. 1979. Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitol.* **78**: 89.

Kirchhoff, L. V. & Hoft, D. F. 1990. Immunization and challenge of mice with insect-derived metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **12**: 65.

Kreti, A. U. & Brener, Z. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigotes antibodies. *J. Immunol.* **128**: 2009.

Laemli, J.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680.

Lages-Silva, E., Ramirez, L. E. Kreti, A. U. & Brener, Z. 1987. Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of

Trypanosoma cruzi blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Parasite Immunol.* **9**: 21.

Laguens, R. P., Mercert, P., Chambo, G. & Gelpi, R. J. 1981. Chronic Chagas' disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. *Medicina (Buenos Aires)* **41**: 40.

Laucella, S. 1995. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Ley, V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V. & Anderws N. W. 1990. The exit of *Trypanosma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* **171**: 401.

Lima, M. M., Sanchez, G. A., Krettli, A. U. & Brener, Z. 1985. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. *Parasite Immunol.* **7**: 367.

Lövgren, K. 1987. Construction and potencial of ISCOMS as immunogen. Tesis doctoral, Sveriges Latbruksuniversitet, Uppsala, Suecia.

Lövgren, K. & Morein, B. 1988. The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (iscoms). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **10**: 161.

Lövgren, K., Kaberg, H. & Morein, B. 1990. An experimental influenza subunit vaccine (iscom): induction of protective immunity to

challenge infection in mice after intranasal or subcutaneous administration. *Clin. Exp. Immunol.* **82**: 435.

McKercher, P. D. 1986. Oil adjuvants. Their use in veterinary biologicals. En: Advances in carriers and adjuvants for veterinary biologics. Nervig et al., eds. Ames: Iowa State University Press, Ames. p 115.

Mejia Lopez, H., Tanner, M.K, Kierszenbaum, F. & Sztejn M. B. 1993. Alterations induced by *Trypanosoma cruzi* in activated mouse lymphocytes. *Parasite Immunology.* **15**: 273.

Ming, M., Ewn, M. E. & Pereira, M. E. A. 1995. Trypanosome invasion of mammalian cells requires of the TGF- β signaling pathway. *Cell.* **82**: 287

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

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

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.

Minoprio, P. 1991. Chagas' disease: CD5 B-cell dependent Th2 pathology?. *Res. Immunol.* **142**: 137.

Minoprio, P., Cury El Cheikh, M., Murphy, E., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Coffman, R., Couthinho, A. & O'Garra, A. 1993. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN- γ dependent. *J. Immunol.* **151**: 4200.

Mirales, D. G., Stoeckle, M. Y., McDermott, D., Finkelman, F. D. & Murray, H. W. 1994. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infec. Immun.* **62**: 1058.

Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Tronstine, M. L., Khan, T. A. & Mosmann, T. R. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr virus gene BCRF1. *Science.* **248**: 1230.

Morein, B., Helenius, A., Simmons, K., Petterson, R., Kääriäinen, L. & Schirrmacher, V. 1978. Effective subunit vaccine against an enveloped animal virus. *Nature.* **276**: 715.

Morein, B., Sundquist, B., Hoglund, S., Dalgaard, K. & Osterhaus, A. 1984. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature.* **308**: 457.

Morein, B. & Simons, K. 1985. Subunit vaccines against enveloped viruses: virosomes, micelles and other protein complexes. *Vaccine*. **3**: 83.

Morein, B., Ekström, J. & Lövgren, K. 1990. Increased immunogenicity of a non-amphipathic protein (BSA) after inclusion into iscoms. *J Immunol.Meth.* **128**: 177.

Morein, B. & Åkerblom, L. 1992. The iscom - an approach to subunit vaccines. En : Isacson RI, editor. Recombinant DNA vaccines. New York; Marcel Dekker, p 369.

Morein, B., Lövgren, K., Rönnerberg, B., Sjölander, A. & Villacres-Eriksson, M. 1995. Immunostimulating complexes. Clinical potential in vaccine development. *Clin. Immunother.* **6**: 461.

Morgan, A.J., Finerty, S., Lövgren, K., Scullion, F.T. & Morein, B. 1988. Prevention of Epstein-Barr (EB) virus-induced lymphoma in cottontop tamarins by vaccination with the EB virus envelope glycoprotein gp340 incorporated into immune-stimulating complexes. *J. Gen. Virol.* **62**: 2093.

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**: 2348.

Mosmann, T. R. & Moore, K. W. M. 1991. The role of IL-10 in cross-regulation of Th1 and Th2 responses. In: *Immunoparasitology today*,

eds. Ash, C. & Callagher, R. B., p. A49. Elsevier Trade Journals, Cambridge.

Mosmann, T. R., Schumaker, J. H., Street, N. F., Budd, R., O'Garra, A., Bond., M. W., Moore, K. W. M., Sher, A. & Fiorentino, D. F. 1991. Diversity of cytokine synthesis and function of CD4⁺ T cells. *Immunol. Rev.* **123**: 209.

Mowat, A. M. & Donachie, A. M. 1991. ISCOMS-a novel strategy for mucosal immunization? *Immunol Today.* **12**: 383.

Mumford, J. A., Jessett, D. M., Rollinson, E. A. 1994. Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines. *Vet. Record.* **134**: 158.

Muñoz, F. M., Fernandez, M. A. & Fresno, M. 1992. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* **22**: 301.

Murgita, R. A. 1976. The immunosuppressive role of alpha-fetoprotein during pregnancy. *Scand. J. Immunol.* **5**: 1003

Neal, R. A. & Johnson, P. 1977. Immunization against *Trypanosoma cruzi* using killed antigens with saponin as adjuvant. *Acta Trop.* **34**: 87.

Nickell, S. P., Stryker, G. A. & Arevalo, C. 1993. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J. Immunol.* **150**: 1446.

O' Neil, G., Tsega, E., Gold, P. & Murgita, R. A. 1982. Regulation of human lymphocyte activation by alpha-fetoprotein. Evidence for selective suppression of Ia-associated T-cell proliferation in vitro. *Oncodev. Biol. Med.* **3**: 135.

O'Garra, A., Chang, R., Go, N., Hastings, R., Haughton, G. & Howard, M. 1992. Ly-1 (B1) cells are the main source of B-cell derived IL-10. *Eur. J. Immunol.* **22**: 711.

Odean, M. J., Frane, C. M., Van derVieren, M., Tomai, M. A. & Johnson, A. G. 1990. Involvement of gamma interferon in antibody enhancement by adjuvants. *Inf. Immun.* **58**: 427.

Ohta, M., Nakashima, I. & Kato, N. 1982. Adjuvant action of bacterial lipopolysaccharide in induction of delayed-type hypersensitivity to protein antigens. II. Relationship of intensity of the action to that of other immunological activities. *Immunobiol.* **163**: 460.

Okino, T., Chakraborty, N. G., Stabach, P., Twardzik, D. R., Padula, S. J. & Mukherji, B. 1993. Inhibition of interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor alpha expression on T cells by a cell-free factor derived from a CD4+ regulatory T cell clone. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **68**: 256.

Oldstone, M. B. A. 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell*. **50**: 819.

Oppenheim, J. J., Kovacs, E. J., Matsushima, K. & Durum, S. K. 1986. There is more than one interleukin 1. *Immunol. Today*. **7**: 45.

Ortega-Barria, E. & Pereira, M. E. A. 1991. A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*: **64**: 411.

Ortiz-Ortiz, L., Parks, D. E., Rodriguez, M. & Weigle, W. O. 1980. Polyclonal B lymphocyte activation during *T. cruzi* infection. *J. Immunol.* **124**: 523.

Ouaissi, M.A., Defort, J. P., Afchain, D., Gras-Masse, H., Cornette, J., Caron, H., Tartar, A. & Capron, A. 1989. Use of synthetic peptides in two different approaches to interfere with host cell penetration by *Trypanosoma cruzi*. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser.* **86**: 43.

Ouassi, M. A., Taibi, A., Cornette, J., Velge, P., Marty, B., Loyens, M., Esteva, M., Rizvi, F. S. & Capron, A. 1990. Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitol.* **100**: 115.

Pace, L. J., Russell, S. W., Torres, A. B., Johnson, H. M. & Gray, P. W. 1983. Recombinant mouse γ -Interferon induces the priming in macrophage activation for tumor cell killing. *J. Immunol.* **130**: 2011.

Paulone, I., Chuit, R., Perez, A. C. & Segura E. L. 1987. Field research on an epidemiological surveillance alternative of Chagas' disease transmission: The Primary Health Care (PHC) strategy in rural areas. *Rev. Soc. Arg. Microbiol.* **40**: 83.

Pestel, J., Defoort, J. P., Gras, M. H., Afchain, D., Capron, A., Tartar, A. & Ouaissi, A. 1992. Polyclonal cell activity of a repeat peptide derived from the sequence of an 85-kilodalton surface protein of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Infect Immun.* **60**: 715.

Petray, P. B., Rottenberg, M. E., Bertot, G., Corral, R. S., Diaz, A., Örn, A. & Grinstein, S. 1993. Effect of anti-gamma-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Lett.* **35**: 77.

Petray, P., Rottenberg, M. E., Grinstein, S. & Örn, A. 1994. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **16**: 193.

Petry, K. & Van Voorhis, W. C. 1991. Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimic mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease. *Res. Immunol.* **142**: 151.

Piuevam, M.R., Russo, D.M., Burns, J.J., Skeiky, Y.A., Grabstein K.H. & Reed, S.G. 1993. Characterization of responses of normal human T cells to *Trypanosoma cruzi* antigens. *J. Immunol.* **150**: 916.

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

Plumas, M. B., Taibi, A., Pessoa, H., Verwaerde, C., Loyens, M., Pommier, V., Velge, P., Capron, A. & Ouaiissi, A. 1993. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins (TcGBP): protection induced by native proteins in an experimental model and analysis of the antibody response. *Res.Immunol.* **144**: 553.

Pyle, S. W., Morein, B., Bess, J. J., Akerblom, L., Nara, P. L., Nigida, S. J., Lerche, N. W., Robey, W. G., Fischinger, P. J. & Arthur, L. O. 1989. Immune response to immunostimulatory complexes (ISCOMs) prepared from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) or the HIV-1 external envelope glycoprotein (gp120). *Vaccine.* **7**: 465.

Ramón, G. 1926. Procèdes por accroïte la production des anti-toxines. *Ann Inst. Pasteur.* **40**: 1.

Reed, S. G., Inverso, A. J. & 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**: 3333.

Reed, S.G. 1988. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* **140**: 4342.

Reed, S.G., Grabstein, K. H., Pihl, D. L. & Morrissey, P. J. 1990. Recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor restores deficient immune responses in mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* **145**: 1564.

Reed, S. G., Brownell, C. E., Russo, D. M., Silva, J. S., Gravstein, K. H. & Morrissey, P. J. 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* **153**: 3135.

Reid, G. 1992 .Soluble proteins incorporate into ISCOMs after covalent attachment of fatty acid. *Vaccine.* **10**: 597.

Ribeiro Dos Santos, R., Marquez, J. O. & Von Gal Furtado, C. C. 1979. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Trop. Med. Parasitol.* **30**: 19.

Roberts, A. B. & Sporn, M. B. 1990. The transforming growth factor-betas. En: M.B Sporn and A.B. Robert (ed.) Peptide growth factors and their receptors. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag, Heidelberg. 7. Capítulo 8.

Roitt, I. 1994. Essential immunology. Ivan Roitt, 8th edition. Blackwell scientific publications.

Rosenbaum, M. 1964. Chagasic myocardopathy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **7**: 199.

Rosenbaum, M., Elizari, M. & Lazzari, J. O. 1968. Los hemibloqueos. Ed. Paidós, Buenos Aires.

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

Rottenberg, M., Lindquist, C., Koman, A., Segura, E. L., Örn, A. 1989. Modulation of both interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 Production during experimental murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand. J. Immunol.* **30**: 65.

Rottenberg, M. E., Rodriguez, D. A. & Örn, A. 1992. Control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice deprived of T-cell help. *Scand. J. Immunol.* **36**: 261.

Ruiz, A., Esteva, M., Cabeza Meckert, P., Laguens, R. & Segura, E.L. 1985. Protection and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **42**: 299.

Ruiz, A., Esteva, M., Riarte, A., Subías, E. & Segura, E.L. 1986. Immunoprotection of mice against *Trypanosoma cruzi* with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. *Immunol. Lett.* **12**: 1.

Ruiz, A., Esteva, M., Subías, E., Moreno, M., Rosenstein de Campanini, A., Velazquez, E. & Segura, E.L. 1990. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: immunoprotection against metacyclic

trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity purified antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **39**:117.

Rönnberg, B., Fekadu, M. & Morein, B. 1995. Adjuvant activity of non toxic *Quillaja saponaria* Molina components for use in iscom-matrix. *Vaccine*. (en prensa).

Sad, S. & Mosmann, T. R. 1994. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J. Immunol.* **153**: 3514.

Said, G., Joskowicks, M. Barreira, A. A. & Eisen, H. 1985. Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. *Ann. Neurol.* **18**: 676.

Schauer, R. 1985. Sialic acids and their role as biological masks. *Trends. Biochem. Sci.* **10**: 357.

Schenkman, R. P. F., Vandkirchove, F. & Schenkman, S. 1993. Mammalian sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **22**: 109.

Schenkman, S., Jiang M-S., Hart, G. W. & Nussenzweig, V. 1991. A novel cell surface trans-sialidasa of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* **65**: 1117.

Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L. & Nussenzweig, V. 1992a. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidas and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J. Exp. Med.* **175**: 567.

Schenkman, S., Kurosaki, T., Ravetch, J. V. & Nussenzweig, V. 1992b. Evidence for the participation of Ssp-3 antigen in the invasion on nonphagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* **175**: 1635.

Schenone, H., Rojas, A., Villarroel, F. & Knierin, F. 1972. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en Chile. Simp. Intern. Enfermedad de Chagas. p 189, Buenos Aires Argentina.

Schmitt, E., Hoehn, P., Huels, C., Goedert, S., Palm, N., Rude, E. & Germann, T. 1994. T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.* **24**: 793.

Schmuñis, G. A. & Szarfam, A. 1977. La Enfermedad de Chagas congénita. *Medicina (Buenos Aires)* **37**: 47.

Schutze, M. P., LeClerc, C., Jolivet, M., Deriaud, E., Audibert, F., Chang, C. C. & Chedid, L. 1987. A potential anti-pregnancy vaccine built by conjugation of the β -subunit of human chorionic gonadotropin to adjuvant-active muramyl peptide. *Am. J. Reprod. Immuno. Microb.* **14**: 84.

Scott, M. T. & Snary, D. 1979. Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Nature*. **282**: 73.

Scott, M. T. & Neal, R. A. 1984. Vaccine potential of cell surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. R. Acad. Sci.* **307**: 36.

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. Ach. Allergy Appl. Immunol.* **74**: 373-377.

Segura, E. L. & Ruiz, A. M. 1993. Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. En: Manual de laboratorio. Enfermedad de Chagas y otras parasitosis. Instituto Nacional de Chagas, septima edición. p 4.

Segura, E. L., Esquivel, M. L., Sosa Estani, S. & Chuit, R. 1993. Control de la enfermedad de Chagas en Argentina. *Rev. Científico PAMI.* **8**: 11.

Sher, A., Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., Clerici, M., Kullberg, M., Pearce, E. J., Berzofsky, J. A., Mosmann, T. R., James, S. L., Morse, H. C. & Shearer, G. M. 1992. Role of T-cell derived cytokines in downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol. Rev.* **127**: 183.

Silva, J. S., Twardzik, D. R. & Reed, S. G. 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by Transforming growth factor β (TGF- β). *J. Exp. Med.* **174**: 539.

Silva, J. S., Morrissey, J. P., Grabstein, K. H., Mohler, K. M., Anderson, D. & Reed, S.G. 1992. Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* **175**: 169.

Sjölander, A., Lövgren, K., Ståhl, S., 1991. High antibody responses in rabbits immunized with influenza virus iscoms containing a repeated sequence of the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA. *Vaccine.* **9**: 443.

Snapper, C. M. & Paul, W. E. 1987. Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science.* **236**: 944.

Snary, D. & Hudson, L. 1979. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. *FEBS Lett.* **100**: 166-.

Snary, D., Flint, J. E., Wood, J. N., Scott, M. T., Chapman, M. D., Dodd, J., Jessell, T. M. & Miles, M. A. 1983. A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurons and glia. *Clin. Exp. Immunol.* **54**: 617.

Snary, D. 1983. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 126.

Solow, R. S., Sodd, M. A., Zollinger, W. D. & Lowell, G. H. 1982. Studies on mitogenicity and adjuvanticity of meningococcal outer membrane proteins in mice. *Fed. Proc.* **41**: 830.

Speijers, G. J., Danse, L. H., Beuvery, E. C., Strik, J. J. & Vos, J. G. 1988. Local reactions of the saponin Quil A and a Quil A containing iscom measles vaccine after intramuscular injection of rats: a comparison with the effect of DPT-polio vaccine. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **10**:425-30.

Staruch, M. J. & Wood, D. D. 1983. The adjuvanticity on interleukin 1 in vivo. *J. Immunol.* **130**: 2191.

Stefani, M. M., Takehara, H. A. & Mota, I. 1983. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Immunol. Lett.* **7**: 91.

Stein, P. & Singer, A. 1992. Similar co-stimulation requirements of CD4+ and CD8+ primary T helper cells: role of IL-1 and IL-6 in inducing IL-2 secretion and subsequent proliferation. *Intern. Immunol.* **4**: 327.

Susuki, Y., Seng, C. Q. & Alpert, E. 1992. Isolation and partial characterization of a specific alpha-fetoprotein receptor on human monocytes. *J. Clin. Invest.* **90**: 1530.

Swain, S. L., Weinberg, A., English, M. & Huston, G. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* **145**: 3796.

Sztein, M.B., Cuna, W. R. & Kierzenbaum, F. 1990. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD 3, CD 4, CD 8 and IL- 2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J. Immunol.* **144**: 3558.

Sztein, M.B. & Kierszenbaum, F. 1992. Suppression by *Trypanosoma cruzi* of T-cell receptor expression by activated human lymphocytes. *Immunology.* **77**: 277.

Taibi, A., Plumas, M. B., Guevara, E. A., Schoneck, R., Pessoa, H., Loyens, M., P, I. R., Aguirre, T., Gras, M. H., Bossus, M. 1993. *Trypanosoma cruzi*: immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *J Immunol.* **151**: 2676.

Takahashi, H., Takeshita, T., Morein, B., Putney, S., Germain, R. N. & Berzofsky, J. A. 1990. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature.* **344**: 873.

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.

Tarleton, R.L. 1988a. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. I. Evidence for the presence of IL-2 producing cells. *J. Immunol.* **140**: 2763.

Tarleton, R.L. 1988b. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J. Immunol.* **140**: 2769.

Tarleton, R. L. 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **144**: 717.

Tarleton, R. L. 1991. The role of T-cell populations in experimental Chagas' disease. *Res. Immunol.* **142**: 130.

Timoney, J. F. & Mukhtar, M. M. 1993. The protective M proteins of the equine group C streptococci. *Vet Microbiol.* **37**: 389.

Tomai, M. A. & Johnson, A. G. 1989. T cell and interferon- γ involvement in the adjuvant action of a detoxified endotoxin. *J. Biol. Resp. Modif.* **8**: 625.

Torres, J.M., Laborda, J., Naval, J., Darracq, N., Calvo, M., Mishal, Z. & Uriel, J. 1989. Expression of alpha-fetoprotein receptors by human T-lymphocytes during blastic transformation. *Molec. Immunol.* **26**: 851.

Torrico, F.H., H., Rivera, M. T., van Marck, E., Billiau, A. & Carlier, Y. 1991., Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* **146**: 3626.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordin, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets:

procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **76**: 4350.

Tunon, P. & Johansson, K. 1984. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrilamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **9**: 171.

Van Voorhis W.C. 1992. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. *J. Immunol.* **148**: 239.

van Binnendijk, R., van, B. C., Poelen, M. C., de, V. P., Boes, J., Cerundolo, V., Osterhaus, A. D. & UytdeHaag, F. G. 1992. Measles virus transmembrane fusion protein synthesized de novo or presented in immunostimulating complexes is endogenously processed for HLA class I- and class II-restricted cytotoxic T cell recognition. *J. Exp. Med.* **176**: 119.

Villacrés-Eriksson, M., Bergström, M. M., Kåberg, H. & Morein, B. 1992. Involvement of interleukin-2 and interferon-gamma in the immune response induced by influenza virus iscoms. *Scand. J. Immunol.* **36**: 421.

Villacres-Eriksson, M. 1993. Induction of immune response by iscoms. Tesis doctoral, Sveriges Latbruksuniversitet, Uppsala, Suecia.

Villacrés-Eriksson, M., Bergström, M. M., Kåberg, H., Lövgren, K. & Morein, B. 1993. The induction of cell-associated and secreted IL-1 by

iscoms, matrix or micelles in murine splenic cells. *Clin. Exp. Immunol.* **93**:120.

Villacrés-Eriksson, M. 1995. Antigen presentation by naive macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. *Clin. Exp. Immunol.* **101**: 46-52.

Voller, A., Draper, C., Bidwell, D. & Bartlett, A. 1975. Microplate ELISA for Chagas disease . *Lancet* **i**, 426.

Voltarelli, J. C., Donadi, E. A. & Falcao, R. P. 1987. Immunosuppression in human acute Chagas' disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 169.

Watson, D. L., Lovgren, K., Watson, N. A., Fossum, C., Morein, B. & Hoglund, S. 1989. Inflammatory response and antigen localization following immunization with influenza virus ISCOMs. *Inflammation.* **13** :641.

White, R. G. 1976. The adjuvant effect of microbial products on the immune response. *Ann. Rev. Microb.* **30**:5 79.

Wirth, J. J., Kierszenbaum, F. & Slotnik, A. 1989. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Immunol.* **66**: 296.

Wirth, J. J., Kierszenbaum, F., Sonnenfeld, G. & Zlotnik, A. 1985. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infec. Immun.* **49**: 61.

Wong, R. L., Ruddle, N. H., Padula, S. J., Lingenheld, E. G., Bergman, C. M., Rugen, R. V., Epstein, D. I. & Clark, R. B. 1988. Subtypes of helper cells. Non-inflammatory type 1 helper T cells. *J. Immunol.* **141**: 3329.

World Health Organization. 1991. Control of Chagas' Disease. WHO Technical Series N° 811. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wrightsman, R. A., Dawson, B. D., Fodus, D. L. & Manning, J. 1994. Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. *J. Immunol.* **153**: 3148.

Zeledón, R. 1972. Los vectores de la enfermedad de Chagas en América. Simp. Intern. Enfermedad de Chagas. p 327, Buenos Aires Argentina.

Zollinger, W. D., Mandrell, R. E., Griffiss, J. M., Altieri, P. & Berman, S. 1979. Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. *J. Clin. Invest.* **63**: 836.

Zügel, U., Schoel, B., Yamamoto, S. 1995. Crossrecognition by CD8 T cell receptor $\alpha\beta$ cytotoxic T lymphocytes of peptides in the self and

mycobacterial hsp60 which share intermediate sequence homology.
Eur. J. Immunol. **25**: 451.

Özel, M., Hoglund, S., Gelderblom, H. R. & Morein, B. 1989.
Quaternary structure of the immunostimulating complex (iscm). *J*
Ultrastruct.Mol. Struct. Res. **102**: 240.