

Tesis de Posgrado

Autoinmunidad en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*

Tekiel, Valeria

2001

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:

Tekiel, Valeria. (2001). Autoinmunidad en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3392_Tekiel.pdf

Cita tipo Chicago:

Tekiel, Valeria. "Autoinmunidad en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3392_Tekiel.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Autoinmunidad en la infección experimental
por *Trypanosoma cruzi***

Lic. Valeria Tekiel

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos
Aires

Directora: Dra. Stella M. González Cappa

Nº 3392

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología
Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires
2001

Agradecimientos

A la Dra. Stella M. González Cappa, por su estímulo, apoyo constante, por exigir siempre un poco más y por su gran comprensión

Al Dr. Gerardo Mirkin, porque no podría haber tenido mejor compañero de laboratorio, por su colaboración acertada, desinteresada y permanente, un verdadero “maestro”

A todos mis compañeros de trabajo del “piso 13”

Los que ya estaban cuando llegué: Susana, Annette, Oscar, Silvina, Estela...
... los que llegaron después: Marisa, Laura, Sabrina, Damián, Rafa, Lubiana, Fer...
.....y los que siguen llegando...Marikena, Gloria, Pía...
con quienes compartí pipetas, laboratorios, almuerzos y seminarios

y especialmente a María Elisa, Catalina, Linus y Lucas, por todo

Al Dr. Rodrigo Correa-Oliveira, en cuyo laboratorio realicé parte de los estudios de caracterización del TCR y especialmente a Guilherme Correa-Oliveira que me aconsejó en la puesta a punto de la técnica

A los Dres. S. Muchnik y Adriana Losavio, con quienes compartí amenas y largas tardes registrando el potencial de acción del nervio ciático

Al Dr. Daniel Sánchez y su grupo, en cuyo laboratorio aprendí a clonar y secuenciar

A la Dra. Marta Jones, que revisó las preparaciones histopatológicas

A todo el personal técnico, becarios, tesistas y docentes del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología

Al Dr. Jorge Geffner, por estar siempre dispuesto a escuchar y dar consejos; por ser un ejemplo de cómo se puede hacer ciencia en este país

A Inés y Andrea, siempre listas para dar una mano con el inglés y el diseño

A los “mineiros” Teofania, Guilherme, Roberta y Stefan por los buenos tiempos pasados lejos de casa

A todos y cada uno de los amigos de la vida

A mi familia

A Aldo

Trabajos publicados relacionados con el tema de Tesis

Tekiel V., Mirkin G. and González Cappa S. M. 1997. Chagas' disease: Reactivity against homologous tissues induced by different strains of *T. cruzi*. *Parasitology*. **115**: 495-502.

González Cappa SM, Mirkin G, Solana ME, **Tekiel V.** 1999. Patología por *Trypanosoma cruzi* ¿cepa dependiente? *Medicina* (Buenos Aires). **59** (supl II): 69-74.

Tekiel V, Losavio A, Jones M, Muchnik S and González Cappa SM. 2001. Changes in the mouse sciatic nerve action potential after epineural injection of sera from *T. cruzi* infected mice. *Parasite Immunology*. En prensa.

Tekiel V, Correa-Oliveira G, Sánchez D, Correa-Oliveira R and González Cappa SM. T cell Receptor V β (TCRV β) repertoire, CDR3 sequence analysis and cytokine expression in tissue lesions of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice. Remitido para su publicación. 2001.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL	i
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
ABREVIATURAS	x
INTRODUCCION	1
1- Agente etiológico, ciclo de vida y epidemiología	1
2- Estadios clínicos y patología	3
2. a- Fase aguda	3
2. b- Fase latente o indeterminada	3
2. c- Fase crónica	4
3- Compromiso del sistema nervioso en la enfermedad de Chagas	5
4- Modelo murino de infección y patología en el arco médula espinal-nervio ciático-músculo esquelético	6
5- Patogenia de la enfermedad de Chagas	9
5. a- Evidencias indirectas de la participación de mecanismos autoinmunes en la patología chagásica crónica	9
5. a. 1- Activación policlonal	9
5. a. 2- Anticuerpos y linfocitos T reactivos contra antígenos tisulares del huésped	10
5. a. 3- Mimetismo molecular	12
5. b- Evidencias directas de la participación de mecanismos autoinmunes	13
5. b. 1- Participación de anticuerpos en patogenia	14
5. b. 2- Participación de LT en patogenia	15
5. c- Hipótesis no autoinmunes	16

	Página
HIPOTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIALES Y METODOS	20
Animales	20
Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>, mantenimiento	20
Infección de ratones de ensayos experimentales	20
<u>A- Participación de anticuerpos en la producción de daño</u>	21
A. 1- Sueros	21
A. 2- Purificación de IgG	22
A. 3- Obtención de antígenos parasitarios liberados (AgPL)	22
A. 4- Serología anti-<i>T. cruzi</i>	22
A. 5- Reactividad de sueros frente a antígenos conformacionales murinos	23
A. 6- Ensayos de Transferencia	24
A. 6. 1- Inyección de sueros	24
A. 6. 2- Inyección de parásitos	25
A. 6. 3- Transferencia de IgG y AgPL	25
A. 7- Estudios en animales receptores	25
A. 7. 1- Conductividad del nervio ciático	25
A. 7. 2- Histopatología y depósitos de factores de suero	27
A. 7. 3- Detección de ADN parasitario en nervios de animales receptores	28

	Página
<u>B- Participación de LT en la producción de daño</u>	29
B. 1- Caracterización de las cadenas Vβ del receptor de células T (TCR)	29
B. 1. 1- Extracción de tejidos	29
B. 1. 2- Aislamiento de ARN	30
B. 1. 3- Transcripción reversa (RT)	30
B. 1. 4- Amplificación del cADN por PCR	31
B. 1. 5- Marcación de sonda	32
B. 1. 6- Detección del producto	33
B. 1. 7- Determinación del uso relativo de cadenas V β del TCR	34
B. 2- Polimorfismo de secuencias de la región CDR3 del TCR	35
B. 2. 1- Clonado de productos, transformación de bacterias y expansión de clones	35
B. 2. 2- Extracción de ADN plasmídico y verificación del tamaño de insertos	37
B. 2. 3- Purificación por PEG y secuenciación	37
B. 2. 4- Análisis de los productos de secuenciación	38
B. 3- Detección de parásitos en tejidos	39
B. 3. 1- Preparación de ADN	39
B. 3. 2- Amplificación por PCR	39
B. 4- Expresión de citoquinas en tejidos	40
ANEXO Soluciones utilizadas para la detección de productos de PCR por dot-bot e hibridización	42

	Página
RESULTADOS	43
<u>A- Participación de factores humorales en patogenia</u>	43
A. 1- Reactividad de sueros frente a antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
A. 2- Reactividad <i>in vitro</i> hacia antígenos conformacionales murinos	44
A. 3- Estudios electrofisiológicos en ratones receptores de sueros	47
A. 4- Estudios electrofisiológicos en ratones receptores de parásitos	50
A. 5- Búsqueda de ADN de <i>T. cruzi</i> en receptores de sueros y parásitos	52
A. 6- Ensayos electrofisiológicos en receptores de IgG y AgPL	53
A. 7- Estudios histopatológicos y búsqueda de IgG por IFI <i>ex vivo</i> en animales receptores	53
<u>B- Participación de LT en la producción de daño</u>	59
B. 1- Caracterización de las cadenas Vβ del receptor de células T	59
B. 1. 1- Puesta a punto de la técnica de RT-PCR para la detección de cadenas Vβ del TCR	59
B. 1. 2- Expresión de cadenas Vβ en bazo de animales controles	62
B. 1. 3- Expresión de cadenas Vβ del TCR en ratones crónicamente infectados con las cepas RA y CA-I de <i>T. cruzi</i>	66
B. 2- Análisis de secuencias de la región CDR3 del TCR	73
B. 2. 1- Polimorfismo del CDR3 en bazo	76
B. 2. 2- Polimorfismo del CDR3 en tejidos blanco de daño	77
B. 2. 3- Polimorfismo del CDR3 en tejidos no blanco de daño	80

	Página
B. 3- Detección de material parasitario en tejidos	82
B. 4- Análisis de citoquinas pro-inflamatorias <i>in situ</i>	83
DISCUSION	86
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFIA	104

RESUMEN

En Argentina, el 10% de la población crónicamente infectada con *Trypanosoma cruzi* presenta patología en sistema nervioso periférico (SNP). En la presente Tesis se estudió la participación de mecanismos inmunes en la inducción de patología a nivel de lo que denominamos genéricamente SNP, representado por el arco médula espinal-nervio ciático-músculo isquiotibial. Empleamos como modelo, ratones C3H/HeN infectados con las cepas RA o CA-I de *T. cruzi* que evidencian signos de daño principalmente en nervio ciático y médula espinal o en músculo esquelético, respectivamente. Además, linfocitos T (LT) de estos animales son capaces de injuriar de manera selectiva los órganos antes mencionados por transferencia pasiva en ausencia de parásitos. Hemos definido esos tejidos como blanco de daño para cada una de las cepas de *T. cruzi*.

La respuesta inmune humoral, evaluada por IFI sobre cortes de tejido normal, no mostró diferencias cepa-dependientes; los patrones de marcación evidenciaron depósitos de IgG en intersticio de músculo y en vainas de mielina en nervio. Los sueros con reactividad positiva hacia antígenos conformacionales de nervio fueron definidos como Ne+. La inyección epineural de sueros Ne+ altera la conducción del nervio ciático de manera cepa-dependiente. Así, sueros de ratones infectados con la cepa RA/Ne+ inducen aumento del tiempo de latencia y disminución en la amplitud del potencial de acción nervioso (PAN) en los animales receptores, 4 días post- inyección (dpy). Por el contrario, sueros de animales infectados con la cepa CA-I no afectan ningún parámetro del PAN. La inyección de IgG purificada de sueros RA/Ne+ también disminuye la amplitud del PAN, indicando la presencia de un menor número de axones funcionantes. En coincidencia se observan depósitos de IgG marcando fibras axonales y/o vainas de mielina e infiltrados inflamatorios leves en los nervios inyectados con suero RA/Ne+ pero no en los inyectados con suero CA-I/Ne+, a los 4 dpy. No se detecta presencia de parásitos en los nervios de animales receptores de sueros (PCR). Las alteraciones del PAN luego de la inyección de suero RA/Ne+ son similares a las detectadas en animales crónicamente infectados y en ratones inyectados con tripomastigotes en el epineuro 17 dpy. En conjunto, estos resultados indican la participación directa de autoanticuerpos en las alteraciones electrofisiológicas observadas en sistema nervioso periférico en la enfermedad de Chagas.

En relación con la participación de LT en esta patología, se estudió el repertorio de las cadenas variables β del receptor de células T (TCRV β) en distintos tejidos de animales crónicamente infectados con ambas cepas de *T. cruzi*. En bazo, se observa la sobre-expresión del segmento TCRV β 13 y sub-expresión del segmento TCRV β 14, lo cual podría ser marcador de infección. En SNP, se detecta un alto número de cadenas expresadas en los tejidos blanco de daño, que refleja la presencia de un importante infiltrado inflamatorio. Significativamente, se observa el uso relativo aumentado del segmento TCRV β 9 en los tejidos blanco de daño para cada cepa: nervio y médula en los animales infectados con RA y músculo en los infectados con CA-I. Esto demuestra la existencia de un patrón de expresión diferencial de segmentos en el sitio de lesión con respecto a la expresión periférica. El clonado, secuenciación y análisis del polimorfismo de secuencia de la región CDR3 de los segmentos TCRV β 9 sobre-expresados demostró una alta proporción de clones idénticos en animales infectados con RA (médula y nervio), que podría estar

indicando la presencia de LT autorreactivos en el sitio de lesión. Además, la elevada producción de citoquinas pro-inflamatorias en los tejidos blanco de daño sugiere que la respuesta inmune local tiene un papel relevante en el proceso inflamatorio. Por otro lado, en los órganos que no son blanco principal de daño para cada una de las cepas de *T. cruzi*, donde no se encontraba sobre-expresión del segmento TCRV β 9, se observó dominancia clonal en la secuencias de la región CDR3. Este hecho, conjuntamente con la imposibilidad de reproducir daño por transferencia pasiva de células, el hallazgo de material parasitario y la baja producción de IL-6 y TNF α , sugiere que los clones mayoritarios detectados en los tejidos que no son blanco principal de daño están dirigidos hacia antígenos parasitarios contribuyendo al control local de la infección.

ABSTRACT

In Argentina, 10% of the chronically *Trypanosoma cruzi*-infected population develops peripheral nervous system (PNS) pathology. Herein we studied the participation of immune mechanisms in the pathology of the PNS (spinal cord-sciatic nerve- hamstring muscle axis). Using the C3H/HeN mouse strain and two *T. cruzi* subpopulations (RA and CA-I) it is possible to induce pathology mainly in skeletal muscle (CA-I) or in sciatic nerve and spinal cord (RA). T cells are able to injure the organs above mentioned in absence of parasites in a strain-dependent way. Therefore, we have defined these organs as target of pathology for each *T. cruzi* strain.

The humoral immune response, evaluated by IFAT, against conformational muscle and nerve antigens was similar for RA and CA-I antisera; deposits of IgG were observed at the interstitial matrix in skeletal muscle and in the myelin sheaths in sciatic nerve. Sera with positive reactivity against sciatic nerve were defined as Ne+. The epineural injection of sera from infected mice in syngeneic recipients altered the sciatic nerve conduction. This effect was parasite-strain dependent since just recipients of sera obtained from mice infected with the RA strain showed electrophysiological alterations. Moreover, among the sera from RA-infected mice, only those RA/Ne+ were able to induce prolonged latencies and diminished amplitudes of the sciatic nerve action potential (SNAP). On the contrary, sera from CA-I-infected mice did not alter any SNAP parameter. The abnormalities observed in the amplitude of SNAP seemed to be mediated by IgG since purified antibodies from RA/Ne+ injected epineurally provoke the same effect than the whole sera, demonstrating the expression of a lower number of functional axons. In accordance with these results, IgG deposits labeling the axonal course and/or myelin sheaths as well as mild inflammatory infiltrates were found in the nerves injected with RA/Ne+ sera but not in those injected with CA-I/Ne+ sera 4 days post-injection (dpi). No parasite DNA was detected in the nerves. SNAP alterations in serum recipients are similar to those observed in chronically-infected animals or in mice injected in the epineurium with trypomastigotes, 17 dpi. Results presented here indicate the direct participation of autoantibodies in the pathology observed in PNS in chronic Chagas' disease.

To analyze the participation of TL in pathology in our model, we have studied the T cell receptor V β (TCRV β) repertoire in different tissues of chronically-infected mice. Overexpression of TCRV β 13 and underexpression of TCRV β 14 segments were observed in spleen of infected mice, suggesting that these peripheral TCRV β usages can be markers of infection. In PNS tissues, it was detected a high number of segments expressed in the target organ of damage, reflecting the strong inflammatory infiltrate. There was an over representation of TCRV β 9 segment in sciatic nerve and spinal cord in RA- and in skeletal muscle in CA-I-infected mice, showing a differential expression pattern between the target organ of disease and the peripheral repertoire.

The sequence polymorphism analysis of the CDR3 region of over-expressed TCRV β 9 segments showed a high proportion of identical clones in sciatic nerve and spinal cord in RA-infected mice, that could denote the presence of autoreactive TL. Moreover, the elevated production of pro-inflammatory cytokines *in situ* suggests that the local immune response is contributing to the severe pathology observed in those organs. On the other

hand, clonal dominance was observed in TCRV β 9 segments not-over-expressed in the tissues that are not the main target of damage for each *T. cruzi* strain. This fact, together with the fail to induce damage by passive cell transfer in these tissues, the presence of parasite *in situ* and the low production of TNF α and IL-6, suggest that the the main clones are directed to parasite antigens and contribute locally to the control of the infection.

Abreviaturas

µg: microgramo
µl: microlitro
µm: micrometro
aa: aminoácido/s
Ac: anticuerpo/s
AcMo: anticuerpo monoclonal/es
ADN: ácido desoxirribonucleico
Ag: antígeno/s
AgPL: Ag parasitarios liberados (al medio, al suero)
ARN: ácido ribonucleico
BSA: albúmina bovina
cADN: ADN copia
Cβ: región constante de la cadena β del TCR
CDR: regiones determinantes de complementariedad o *complementarity determining region*
DE: desvío estandar
DEPC: di-etil-pirocarbonato
DIG: digoxigenina
dNTPs: deoxinucleótidos tri-fosfato
DO: densidad óptica
dpy: días post- inyección (epineural)
EDTA: ácido dietilendiamino tetraacético
EMG: electromiografía/grama.
FITC: isotiocianato de fluoresceína
g: aceleración de la gravedad
H&E: hematoxilina de Mayer/ Eosina
hr: hora/s
idp: intradermopltar
Ig: inmunoglobulina
IHQ: inmunohistoquímica
ip: intraperitoneal
IPTG: isopropil-b-tiogalactósido
kDa: kilodalton
LT: linfocito/s T
MHT: microhematocrito
N₂: nitrógeno líquido
OPD: ortofenildiaminobenzidina
PAN: potencial de acción del nervio ciático
pb: pares de bases
PBS: solución salina tamponada con fosfatos

PBS-suero: PBS suplementado con 10% de suero homólogo
PBS-T-L: PBS-Tween 0,01%- Leche descremada 5%
PEG: polietilenglicol
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pi: post- infección (dpi: días pi)
PM: peso molecular
rpm: revoluciones por minuto
RT: transcripción reversa
SDS: dodecilsulfato de sodio
SNP: sistema nervioso periférico
T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*
TA: temperatura ambiente
TCR: receptor de células T
T_m: temperatura de hibridización
trip: tripomastigotes circulantes
Vβ: región variable de la cadena β del TCR
V_{max}: velocidad máxima

Introducción

1- Agente etiológico, ciclo de vida y epidemiología

Schizotrypanum cruzi es el nombre con el cual el científico brasileño Carlos Chagas bautizó al protozoo que descubrió en la sangre de niños, animales domésticos y en el insecto *Panstrongylus megistus* en zonas rurales del estado de Minas Gerais en 1909. Actualmente, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas se conoce como *Trypanosoma cruzi*, parásito protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida. Los microorganismos de este orden se caracterizan por la presencia de una estructura citoplasmática denominada kinetoplasto que contiene aproximadamente el 20% del total de ADN y cuya ubicación relativa con respecto al núcleo permite identificar a los estadios extracelulares. El parásito alterna en su ciclo de vida entre un huésped definitivo vertebrado mamífero y un insecto hematófago vector de la familia Reduviidae. Presenta diferentes estadios que le permiten adaptarse a los diferentes hábitats:

Esferomastigote: de forma esférica con un largo flagelo rodeando el soma; estadio replicativo presente en el intestino anterior del vector (revisado por Tyler y Engman, 2001).

Epimastigote: de forma alargada, presenta el kinetoplasto en posición anterior con respecto al núcleo y el flagelo libre en casi toda su extensión. Se encuentra en el intestino medio del vector donde constituye la forma replicativa.

Tripomastigote: de forma alargada, presenta el kinetoplasto posterior al núcleo. Debido a que el flagelo nace en la proximidad del kinetoplasto, emerge por un costado del soma del parásito y lo recorre por debajo de la membrana citoplasmática para liberarse finalmente por el extremo anterior, da la imagen de una membrana ondulante extensa. Este estadio es incapaz de dividirse y se encuentra en la ampolla rectal del vector (metacíclico) y en la sangre del mamífero (circulante).

Amastigote: de forma esférica u ovalada, con flagelo poco aparente. Es de localización intracelular en el huésped mamífero donde representa la forma replicativa.

La infección del insecto vector con *T. cruzi* se produce cuando éste se alimenta con la sangre de un mamífero que posee tripomastigotes circulantes. Dentro del tubo digestivo del triatomíneo, el tripomastigote se diferencia a esferomastigote y luego éste a epimastigote; ambas formas se multiplican por fisión binaria en el intestino medio. El epimastigote progresa hasta el intestino posterior donde continúa multiplicándose; luego se diferencia a

tripomastigote metacíclico, que no se multiplica y se aloja en la ampolla rectal. Después de picar a un mamífero para alimentarse, el vector infectado deposita en piel o mucosas las heces conteniendo tripomastigotes metacíclicos con capacidad infectiva. El parásito penetra por lesiones en la epidermis o por mucosas e invade las células dendríticas de la piel y fibroblastos del tejido subcutáneo. Durante el proceso de invasión celular, los lisosomas de la célula del mamífero se concentran en el punto de adhesión del parásito. Los lisosomas se fusionan con la membrana plasmática formando un compartimento vacuolar que permite la entrada del parásito. La acidificación de la vacuola parasitófora activa la secreción de una porina parasitaria que facilita la salida del tripomastigote de la vacuola. Posteriormente se diferencia a amastigote el cual se multiplica en el citoplasma celular formando un pseudoquiste. En altas densidades, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes circulantes, los cuales generalmente escapan del pseudoquiste al torrente sanguíneo y son capaces de invadir nuevas células. Ocasionalmente, células que se lisan prematuramente también pueden liberar amastigotes, los cuales excepcionalmente pueden ser observados en sangre durante la fase aguda de la infección (revisado por Tyler y Engman, 2001). El parásito es capaz de invadir distintas células y tejidos: preferentemente afecta corazón, músculo esquelético, sistema fagocítico-mononuclear, aparato digestivo y sistema nervioso. El ciclo se cierra cuando el tripomastigote circulante es succionado por una vinchuca sana mientras se alimenta.

Actualmente la enfermedad de Chagas afecta a 16- 18 millones de personas en el continente americano y se considera que 100 millones están en riesgo de infección (Moncayo, 1997). Como enfermedad enzoótica, se extiende desde la latitud 42°N en California hasta el paralelo 43°S en la patagonia, que es la zona de distribución del vector. Campañas sostenidas de fumigación de viviendas en zonas rurales pronostican el control de la transmisión de la enfermedad de Chagas por la vía vectorial (Moncayo, 1997). Otras formas de infección como la transfusional, congénita o por trasplante de órganos han cobrado mayor importancia relativa y la enfermedad está lejos de ser erradicada, al menos en las próximas décadas.

2- Estadios clínicos y patología

2. a- Fase aguda

La infección reciente generalmente no es evidente ya que los signos y síntomas son tan leves e inespecíficos que no se asocian con la infección por *T. cruzi*. La característica principal de esta fase es la presencia de parásitos circulantes fácilmente detectables en sangre por métodos directos, que son los de elección para realizar el diagnóstico. En los casos en que el período agudo presenta signos patognomónicos de infección puede reconocerse el sitio de entrada del parásito por la presencia del chagoma de inoculación que es a menudo acompañado por la inflamación de nódulos linfáticos satélites. También pueden detectarse fiebre y hepato-esplenomegalia. Excepcionalmente y con mayor frecuencia en niños pequeños, la fase aguda tiene un curso más grave evidenciado por miocarditis aguda o meningoencefalitis que puede desencadenar la muerte del paciente (revisado por Rassi y col, 2000).

Aún sin mediar tratamiento médico la mayoría de los individuos infectados se recuperan de la fase aguda, la cual culmina cuando la parasitemia disminuye a niveles difícilmente detectables por métodos de diagnóstico directo convencionales como consecuencia de la respuesta inmune del huésped.

2. b- Fase latente o indeterminada

Laranja y col (1956) definieron claramente el concepto de esta etapa al señalar: “...el período asintomático descrito como forma indeterminada comprende un tiempo prolongado, generalmente entre 10 y 20 años, entre el final de la fase aguda y el establecimiento de las lesiones [cardíacas] en la etapa crónica. Durante este período latente asintomático los individuos deben ser considerados como pertenecientes a la categoría de potenciales enfermos cardíacos. En las áreas endémicas este grupo indeterminado es el más numeroso dentro del total de pacientes infectados con *T. cruzi* (...) y su importancia radica en los aspectos epidemiológicos.” ya que constituyen un reservorio importante de la infección y contribuyen a mantener el ciclo de vida del parásito.

El criterio utilizado para clasificar a los pacientes en esta etapa es el siguiente:

- serología positiva para Chagas
- ausencia de signos y síntomas de enfermedad
- electrocardiograma normal
- radiografía de tórax normal
- examen del aparato digestivo normal

2. c- Fase crónica

Diez o más años luego del inicio de la infección un porcentaje variable de individuos desarrollará manifestaciones cardíacas y/o digestivas, dependiendo del área geográfica, que caracterizan el estadio crónico de la enfermedad. La cardiopatía crónica, detectada en el 27% de la población infectada, es la más frecuente y sus síntomas más comunes son disnea y palpitaciones. Los casos “leves” son compatibles con alteraciones del electrocardiograma como por ejemplo bloqueo completo de rama derecha y/o hemibloqueo anterior izquierdo, latidos ventriculares unifocales prematuros y cambios primarios de la onda T. En los casos severos se detecta bloqueo atrioventricular, latidos prematuros frecuentes y multifocales y fibrilación atrial en el electrocardiograma, alteraciones que acompañan generalmente agrandamiento del órgano (Schmuñis, 1994).

Las manifestaciones digestivas, como megacolon o megaesófago, se han comunicado principalmente en pacientes de la parte central de Brasil, donde la prevalencia de esta patología es tres veces mayor que en otros países americanos. Las manifestaciones más frecuentes son disfagia y odinofagia, con los subsiguientes signos de malnutrición (Schmuñis, 1994).

3- Compromiso del sistema nervioso en la enfermedad de Chagas

Desde las primeras descripciones, la enfermedad de Chagas fue relacionada con alteraciones del sistema nervioso (SN). Las descripciones histopatológicas de Vianna en 1911 establecieron el compromiso del sistema nervioso central (SNC) en la fase aguda de la infección por *T. cruzi*. En 1916, Carlos Chagas describió el compromiso difuso del tejido nervioso en esta fase de la enfermedad y mencionó el parasitismo de células localizadas en el cerebro, cerebelo, núcleos de la base, tronco y médula espinal. La mayoría de los parásitos se hallaban en macrófagos y células gliales y sólo raras veces en neuronas. Según Köberle (1968) la intensa denervación central y periférica observada en la fase aguda de la enfermedad sería la base racional para explicar las manifestaciones clínicas observadas en la fase crónica, incluyendo las megavisceras y cardiomiopatía.

Existen numerosos trabajos que demuestran alteraciones anatómicas y funcionales en el sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático en pacientes con patología crónica digestiva o cardíaca (revisado por Lazzari, 1994). Las lesiones del tracto digestivo se relacionan con grados variables de destrucción de las células del sistema nervioso intrínseco y un proceso inflamatorio. La denervación parece ser un fenómeno importante en la patología de la enfermedad de Chagas y la degeneración de neuronas también se observa en los ganglios parasimpáticos del corazón de pacientes chagásicos; esto sostiene la teoría neurogénica que explica la cardioneuropatía chagásica (revisado por Iosa, 1994).

En pacientes con infección crónica se ha descrito compromiso del sistema nervioso periférico (SNP) en el 3% de la población total latinoamericana (Moncayo, 1997). En 1977 de Faria y col comunicaron alteraciones en el registro electromiográfico con disminución del número de unidades motoras funcionantes. En nuestro país, Sica y su grupo estudiaron 995 pacientes y evidenciaron anomalías del SNP en más del 10% de la población infectada (revisado por Sica y col, 1995). Entre las alteraciones registradas se observó denervación parcial de alguno(s) de los músculos (más frecuentemente en miembros inferiores) evidenciada en ensayos electromiográficos por disminución de unidades motoras funcionantes (revisado por Sica, 1994). El tamaño de las unidades motoras remanentes estaba aumentado en relación a los controles lo cual sugería que la denervación había sido

compensada por reinervación de las fibras musculares por colateralización axonal a partir de axones indemnes (Sica y col, 1979). Esto fue confirmado por hallazgos histológicos que mostraban la existencia de agrupamiento de fibras musculares (Sica y col, 1979; Taratuto y col, 1978).

El estudio del comportamiento de los nervios mostró reducción en los valores de conducción y al medir la amplitud del potencial sensitivo más de un tercio de los enfermos mostraba valores reducidos en cualquiera de los niveles estudiados a lo largo del nervio (Sica y col, 1986; Sica y col, 1991). Estas observaciones permitieron incluir al tronco nervioso como uno de los sitios de lesión ya que las alteraciones encontradas evidenciaban la desmielinización del nervio y la pérdida axonal. En el estudio histológico del nervio safeno externo se observó pérdida de fibras mielínicas, existencia de cubiertas mielínicas delgadas en relación con el diámetro axonal y presencia de grupos de axones de bajo diámetro (Sica y col, 1986).

La transmisión entre el nervio y el músculo también se vio afectada ya que se registró disminución o incremento de la amplitud de la respuesta luego del estímulo repetitivo a intensidad supramáxima (García-Erro y col, 1989).

4- Modelo murino de infección y patología en el arco médula espinal- nervio ciático-músculo esquelético

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo experimental en ratón que reproduce adecuadamente las alteraciones encontradas en humanos como consecuencia de la infección por *T. cruzi* en los distintos niveles de la unidad motora (médula espinal, nervios motores y sensitivos, placa mioneural y músculo esquelético).

El primer modelo estudiado se obtuvo infectando ratones exocriados Rockland con tripomastigotes de la cepa no letal CA-1. Estudios electromiográficos e histológicos permitieron confirmar procesos denervatorios y reinervatorios en la placa neuromuscular, miositis con compromiso perivascular, neuritis intramuscular, neuropatías inflamatorias con fibras desmielinizadas y degeneración axonal en animales crónicamente infectados

(González Cappa y col, 1987). Estudios posteriores demostraron compromiso muscular primario, evidenciado por disminución de la duración y amplitud de los potenciales de unidad motora, desde tiempos tempranos post-infección (15 dpi) (Losavio y col, 1989).

Otros investigadores también estudiaron la histopatología neuromuscular en modelos murinos de enfermedad de Chagas. Said y col (1985) trabajando con ratones C3H y CBA y con parásitos de la cepa CL describieron la presencia de infiltrados granulomatosos perivasculares asociados con lesiones por pérdida de mielina en fibras nerviosas adyacentes y destrucción de fibras, vasculitis e infiltrados de características similares en músculo. Molina y col (1987) trabajando con ratones C3H y parásitos de la cepa Tulahuén también puntualizaron diversas alteraciones en las fibras musculares y en la unión neuromuscular, neuropatía inflamatoria, desmielinización, degeneración axonal e infiltrados inflamatorios en médula espinal asociados con destrucción tisular. En un estudio diseñado para evaluar la funcionalidad del nervio ciático, Losavio y col (1993) detectaron disminución de la amplitud y aumento del tiempo de latencia del potencial de acción del nervio ciático (PAN). Estos hallazgos sugieren que el número de axones funcionantes dentro del nervio está disminuído y que la vaina de mielina que lo recubre está dañada; esto último concuerda con las diversas publicaciones que indican un proceso desmielinizante en la infección crónica por *T. cruzi*.

Con el objetivo de encontrar un método sencillo que permitiera evaluar el compromiso denervatorio o muscular primario en la infección experimental por *T. cruzi*, Sanz y col (1991) estudiaron los efectos sobre los potenciales de unidad motora (PUMs) de distintas asociaciones entre cepas parasitarias (Tul, CA-I, RA) y murinas (C3H/HeN, C57Bl, Balb/c, Swiss, NIH). Las evaluaciones electromiográficas (EMG) demostraron aumentos en la amplitud, duración y número de fases de los PUMs en las asociaciones Tul-C3H/HeN, Tul-C57Bl y RA-C3H/HeN sugiriendo reinervación de fibras musculares, previamente denervadas, por colaterales provenientes de axones sanos, lo que indica claramente daño neurógeno. Por otro lado, animales C3H/HeN y NIH crónicamente infectados con la cepa CA-I evidenciaron disminuciones de la amplitud y duración y aumento del número de fases de los PUMs, lo que indica un daño muscular primario (Sanz y col, 1991). De acuerdo a

estos resultados, la detección sistemática de lesiones EMG en ratones endocriados C3H/HeN lo señalan como el modelo animal más adecuado para el estudio de las alteraciones del SNP inducidas por la infección con *T. cruzi*.

Estudios histopatológicos realizados a distintos tiempos post- infección en músculo esquelético, nervio ciático y médula espinal en ratones C3H/HeN infectados con las cepas RA y CA-I permitieron corroborar los hallazgos electrofisiológicos previos (Mirkin y col, 1994). En animales infectados con la cepa RA se observaron infiltrados leves a los 15 dpi (infección aguda) y moderados a los 120 y 270 dpi principalmente compuestos por células mononucleares en músculo esquelético. También se registraron vasculitis, infiltrados perivasculares y –en el período crónico tardío (270 dpi)- obstrucción vascular con signos miopáticos moderados. En el mismo tejido pero en animales infectados con la cepa CA-I se detectaron infiltrados leves y moderados a los 15 dpi así como vasculitis, infiltrados perivasculares, obstrucción vascular y cambios miopáticos severos (centralización nuclear, necrosis, splitting, etc.) en animales con infección crónica.

La histología del nervio ciático reveló en epi- y endoneuro infiltrados perivasculares leves a moderadas e infiltrados perivasculares en animales con infección aguda o crónica temprana (120 dpi) con la cepa RA. A los 270 dpi, se detectaron infiltrados intensos, cámaras de digestión de mielina y degeneración axonal. Por el contrario, en animales infectados con la cepa CA-I sólo se hallaron infiltrados leves en nervio a los 15 y 120 dpi principalmente en peri- y endoneuro e infiltrados moderados a los 270 dpi. Así mismo, en médula espinal en ratones infectados con la cepa RA se detectaron infiltrados leves a los 15 dpi, moderados a los 120 e intensos a los 270 dpi mientras que los infectados con CA-I presentaron infiltrados leves en todos los tiempos estudiados (Mirkin y col, 1994).

El fenotipo celular predominante en los infiltrados inflamatorios también dependió de la cepa de *T. cruzi*, del tejido y del tiempo post-infección (Mirkin y col, 1994). Los rasgos más destacados en la infección por la cepa CA-I fueron el predominio de linfocitos T CD4 en músculo esquelético durante la fase aguda y crónica temprana y la presencia de linfocitos B con IgM de superficie en la fase crónica en todos los tejidos. Las características más relevantes de la infección con RA fueron el predominio de linfocitos T CD8 en tejido

nervioso durante todo el curso de la infección, y la presencia de células NK en tejido muscular y células CD4⁺ CD8⁻ en tejido nervioso, durante la fase crónica.

5- Patogenia de la enfermedad de Chagas

La presencia de infiltrados celulares mononucleares de importante magnitud, asociada a la escasa presencia de parásitos y de antígeno parasitario en las lesiones cardíacas y del sistema nervioso periférico en la fase crónica de la enfermedad, indujo a muchos grupos de investigación a evaluar si la respuesta inmune desencadenada por el parásito era, al menos en parte, responsable de la patología observada. Numerosas líneas de investigación desarrolladas tuvieron como objetivo determinar de qué manera la inmunidad humoral o celular estaban involucradas en la patogenia de la enfermedad de Chagas.

5. a- Evidencias indirectas de la participación de mecanismos autoinmunes en la patología chagásica crónica

5. a. 1- Activación policlonal

Estudios realizados en el modelo murino de infección por *T. cruzi* demuestran que existe una activación indiscriminada de linfocitos durante la infección aguda, que abarca componentes humorales y celulares (Minoprio y col, 1989a). La respuesta inmune humoral es policlonal e inespecífica ya que la mayoría de los linfocitos B activados no reconocen antígenos de *T. cruzi* (Minoprio y col, 1988). Además, la mayor parte de estas células B – que secretan anticuerpos de isotipos IgG1 e IgG2- reaccionan con antígenos propios del huésped como miosina, ADN, mioglobina, queratina, etc. (Minoprio y col, 1988, 1989a y b; Spinella y col, 1990, 1992). En un caso de infección accidental por *T. cruzi*, Grauert y col (1993) encontraron un marcado incremento de los niveles séricos de Igs durante la fase aguda. Se observó activación policlonal de IgG, IgM e IgA detectándose reactividad no sólo hacia antígenos parasitarios sino también hacia laminina, tubulina, BSA, etc. Sin

embargo, la activación policlonal que en el modelo murino se ha comunicado que puede persistir aún durante la fase crónica de la enfermedad (D'Imperio Lima y col, 1986), no ha sido registrada en casos humanos con enfermedad de Chagas crónica (Grauert y col, 1993).

Con respecto a la activación policlonal T, se ha demostrado su existencia, al menos en el modelo murino (D'Imperio Lima y col, 1985). Minoprio y col (1986 a; b) comunicaron actividad proliferativa aumentada de linfocitos L3T4⁺ (CD4) y Lyt 2⁺ en bazo y ganglios linfáticos de ratones con infección aguda. Una parte de los linfocitos Lyt2⁺ activados policlonalmente presentaron capacidad para diferenciarse a LT citotóxicos efectores.

Las explicaciones para interpretar la activación policlonal incluyen la producción de mitógenos no específicos por parte del parásito y la posible delección y/o modificación de la función de células inmunorregulatorias (Minoprio y col, 1989 a, b; Minoprio, 2001). La consecuencia de la activación policlonal inespecífica ha llevado a sostener una de las hipótesis que explican el fenómeno autoinmune de la patología chagásica crónica. La infección parasitaria produciría desarreglos en las redes de inmunorregulación, llevando a una disminución de la tolerancia hacia antígenos propios y a una activación inespecífica de clones autorreactivos.

5. a. 2- Anticuerpos y linfocitos T reactivos contra antígenos tisulares del huésped

Los primeros trabajos que demostraron la presencia de anticuerpos autorreactivos, y por ende hicieron referencia a la participación de mecanismos autoinmunes en la enfermedad de Chagas, fueron publicados en la década del 70. En dichos trabajos se describía la presencia de anticuerpos reactivos contra antígenos de endocardio, vasculares e intersticiales (EVI) (Cossio y col, 1974) y contra vainas de Schwan de nervios periféricos (Khoury y col, 1979) en sueros de pacientes con infección por *T. cruzi*. Sin embargo, años más tarde los mismos autores se retractaron al advertir que la reactividad observada era consecuencia de ensayar los sueros humanos frente a tejidos no humanos (Khoury y col, 1983). A pesar de esto, ya el primer trabajo había logrado llamar la atención de la

comunidad científica en relación con la participación de mecanismos autoinmunes en la enfermedad de Chagas. En 1979, Ribeiro dos Santos y col. demostraron la presencia de IgG en el 83% de los sueros de pacientes con infección crónica (n=230) capaces de reaccionar con tejido nervioso simpático, parasimpático y/o central humano y de otras especies (aunque en estos casos tuvieron la precaución de adsorber los anticuerpos heterofilos). En el trabajo mencionado, los autores no encontraron relación entre la reactividad hacia antígenos de sistema nervioso y el estado clínico de los pacientes ni consiguieron evitar la autorreactividad por adsorción de los sueros con antígenos parasitarios.

Posteriormente, aparecieron numerosos trabajos en la literatura especializada que daban cuenta de la presencia de anticuerpos reactivos contra distintos antígenos de sistema nervioso (Gea y col, 1993; Tekiel y col 1997), músculo esquelético (McCormick y Rowland, 1993; Laguens y col, 1994; Tekiel y col, 1997) y corazón (McCormick y Rowland, 1989; Tibbets, 1994, Tekiel y col, 1997). Si bien en la mayoría de estos trabajos no se identificaba un antígeno determinado, su relevancia radica en demostrar cuáles son los principales tejidos blanco de la respuesta humoral autorreactiva durante el curso de la infección. Más aún, tanto Tibbets y col (1994) como Tekiel y col (1997) demostraron la presencia de una importante respuesta autorreactiva anti-corazón y anti-sistema nervioso, respectivamente, desde tiempos tempranos de la infección cuando la respuesta inmune específica anti-parasitaria no había sido montada por el huésped.

Otros investigadores describieron reactividad de sueros de pacientes o animales infectados contra antígenos más definidos: proteínas ribosomales (Levin y col, 1989), proteínas asociadas a microtúbulos (Kerner y col, 1991), histonas y ribosomas (Bonfa y col, 1993), entre otras. Es sabido, sin embargo, que una gran cantidad de moléculas han permanecido sin cambios o se han modificado mínimamente durante el proceso evolutivo y por ello la capacidad de que anticuerpos autorreactivos participen activamente en el proceso patogénico de la enfermedad de Chagas crónica debe ser probada debidamente. Por ejemplo, Bonfa y col. (1993), detectaron anticuerpos reactivos anti-histonas en el 12% de los sueros ensayados y un porcentaje todavía menor contra ribosomas. Siendo estos antígenos altamente conservados entre especies, resta determinar el papel fisiológico de esta reactividad teniendo en cuenta principalmente la baja proporción de sueros reactivos.

Así mismo, se ha demostrado que linfocitos de pacientes infectados con *T. cruzi* son capaces de proliferar en presencia de extractos de corazón humano (Todd y col, 1983; Mosca y Plaja, 1981). En 1989, Rizzo y col. demostraron que células de ganglios linfáticos de animales crónicamente infectados proliferaban *in vitro* cuando eran incubados con miosina de músculo esquelético. Por otro lado Mirkin y col. (1997) demostraron que LT CD4 y CD8 de animales crónicamente infectados con la cepa RA proliferaban intensamente frente a antígenos de sistema nervioso pero no frente a antígenos de músculo esquelético mientras que LT de ratones infectados con la cepa CA-I proliferaban escasamente frente a antígenos nerviosos y musculares.

5. a. 3- Mimetismo molecular

Otra posible explicación de la autorreactividad encontrada en la enfermedad de Chagas es la existencia de mimetismo molecular entre antígenos del parásito y el huésped. El mimetismo molecular sería la causa por la cual las respuestas celular y humoral inicialmente dirigidas contra antígenos parasitarios, reaccionarían contra antígenos propios. A partir de la década del '80 distintos grupos de investigación detectaron epitopes de reactividad cruzada entre componentes de *T. cruzi* y de sistema nervioso (Wood y col, 1982; Snary y col, 1983; Petry y col, 1987; Van Voorhis y Eisen, 1989), músculo (Zwerner y col, 1994), receptores β -adrenérgicos (Ferrari y col, 1995), cadena pesada de miosina cardíaca (Cunha Neto y col, 1995), etc.

Relevancia particular tuvo el trabajo de Van Voorhis y Eisen (1989) que identificó una proteína flagelar de tripomastigotes de 160 kDa (Fl-160) que presenta mimetismo molecular con una proteína de sistema nervioso de 48kDa; el epítipo compartido fue mapeado en una secuencia de 12 aminoácidos (Van Voorhis y col, 1991). Sin embargo, el análisis detallado de la reactividad cruzada entre la proteína parasitaria y nerviosa sólo fue realizado en sueros de 2 pacientes crónicamente infectados y no hay datos acerca del porcentaje de sueros que reaccionan con el polipéptido de 48kDa pero no con el epítipo de reactividad cruzada de 12aa. Más aún, los ensayos de inhibición de la reactividad contra

nervio luego de la incubación con FI-160 fueron desarrollados utilizando anticuerpos purificados anti-FI-160 o anticuerpos humanos anti-48 inmunoseleccionados.

En nuestro modelo experimental, más del 80% de sueros de animales infectados evaluados por western blot presentaron reactividad contra antígenos de sistema nervioso y el 42% de los mismos detectó una banda de 48kDa. Sin embargo, cuando se ensayó si los anticuerpos dirigidos contra el antígeno de 48kDa detectaban el epítipo de reactividad cruzada utilizando las proteínas recombinantes FI-160 y 48 X, sólo 9/25 sueros reconocieron el epítipo de 12 aa responsable de la reactividad cruzada entre ambas moléculas. Esto indica que los epítopos reconocidos por la mayoría de los sueros son distintos del postulado como de reacción cruzada (Tekiel y col, 1997). Los anticuerpos dirigidos hacia la proteína FI-160 o el péptido de 12 aa tampoco pudieron ser asociados con formas cardíacas ó digestivas de la enfermedad (Cetron y col, 1992). En resumen, la existencia de mimetismo molecular entre antígenos de *T. cruzi* y su huésped mamífero no necesariamente implica una relación directa con la patología observada en la fase crónica de la enfermedad.

5. b- Evidencias directas de la participación de mecanismos autoinmunes

Como se mencionó anteriormente, la existencia de mimetismo molecular entre antígenos de *T. cruzi* y de órganos blanco de daño, la escasez de parásitos en asociación con la importante presencia de infiltrados linfocitarios en los sitios de lesión y la respuesta inmune (T y B) autorreactiva detectada durante la infección, son hechos que apoyan la participación de mecanismos autoinmunes en la patogenia de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, los criterios que deben cumplirse para clasificar una determinada etiología como autoinmunitaria incluyen también la demostración directa de que es la respuesta anti-lo propio la que media el daño tisular. Esto abarca, por ejemplo, la capacidad de inducir la enfermedad *in vivo* mediante transferencia pasiva de células o suero en ausencia de parásitos, la capacidad de células o anticuerpos de dañar o alterar la funcionalidad de los tejidos *in vitro*, la posibilidad de aislar células T autorreactivas que infiltran el órgano blanco de lesión y el uso restringido de segmentos variables del receptor de células T (TCR) *in situ* (Rose y Bona, 1993).

5. b. 1- Participación de anticuerpos en patogenia

El primer indicio en este sentido fue comunicado por Sterin-Borda y col (1976) quienes observaron que preparaciones de aurícula de rata incubadas con IgG de suero de pacientes infectados mostraban un incremento de la frecuencia de contractilidad. Trabajos posteriores del mismo grupo demostraron la presencia de anticuerpos dirigidos hacia receptores muscarínicos colinérgicos del miocardio con diferentes distribuciones entre pacientes presentando (o no) síndrome disautonómico (Borda y col, 1984; Sterin-Borda y col, 1991). Los anticuerpos anti-receptor tenían capacidad de alterar la funcionalidad de los mismos, involucrando en algunos casos la transducción de señales y actividad de segundos mensajeros (ej. AMPc, GMPc) (Goin y col, 1997). Elies y col (1996) demostraron la existencia de una alta prevalencia de anticuerpos dirigidos contra el receptor muscarínico M2 y –en menor medida- contra receptores $\beta 1$ y $\beta 2$ adrenérgicos en suero de pacientes infectados utilizando péptidos correspondientes a los rulos extracelulares de diferentes receptores cardíacos. *In vitro*, IgG de estos pacientes mostraron un efecto cronotrópico positivo sobre cardiocitos de rata de cultivo como consecuencia de la activación de receptores $\beta 1$ -adrenérgicos y muscarínicos. Por otro lado, de Oliveira y col (1997) llegaron a resultados similares, mostrando que sueros de pacientes chagásicos eran capaces de disminuir la frecuencia cardíaca y/o bloquear la conducción aurículo-ventricular en un sistema *in vitro* utilizando corazones de conejos. El mismo grupo posteriormente demostró que el efecto fisiológico sobre la contractilidad cardíaca era bloqueado por los péptidos P0 y P2 β derivados de la proteína ribosomal P de *T. cruzi* que poseen homología con el segundo loop extracelular del receptor muscarínico (Ferrari y col, 1995; Masuda y col, 1998). Además, López Bergami y col (1997) lograron reproducir las alteraciones electrocardiográficas típicas de la infección crónica por *T. cruzi* al inmunizar animales con el péptido Tc P2 β . Esto se correlacionaba con una respuesta humoral anti-P aunque la inmunización no logró inducir lesiones cardíacas con presencia de infiltrados inflamatorios que acompañasen el trastorno electrofisiológico.

5. b. 2- Participación de LT en patogenicidad

En 1978 Teixeira y col demostraron que linfocitos de pacientes infectados ejercían un efecto citotóxico sobre células cardíacas fetales humanas. En 1985 Acosta y Santos Busch y en 1988 Laguens y col. demostraron la acción citolítica de linfocitos de ratones infectados sobre fibras miocárdicas singeneicas, validando el modelo experimental en este aspecto. Por transferencia de células CD4+ provenientes de animales crónicamente infectados se ha logrado reproducir en los receptores lesiones mediadas por mecanismos de hipersensibilidad en tejido nervioso (Said y col, 1985; Hontebeyrie-Joskowicz y col, 1987) y cardíaco (Ribeiro dos Santos y col, 1992) *in vivo*. Utilizando el modelo de infección C3H/HeN-RA o CA-I, Mirkin y col (1997) demostraron que los LT de ratones infectados son capaces de transferir patología, diferenciándose el fenotipo linfocitario efector y el tejido blanco de daño según la población parasitaria empleada en la infección de los animales dadores de células. Una crítica que puede hacerse a los experimentos de transferencia de patología, es que en los mismos se evalúa el daño en los receptores a tiempos cortos post-transferencia. Por lo tanto, el efecto observado podría ser transitorio y requerirse –para perpetuarlo- del estímulo parasitario persistente en el huésped receptor.

Cunha Neto y col (1996) reportaron que clones CD4+ aislados de corazón de pacientes con enfermedad crónica proliferaban *in vitro* luego de la estimulación con la cadena pesada de miosina cardíaca o con la proteína recombinante B13 de *T. cruzi*, que en un trabajo previo habían sido identificadas como antígenos de reactividad cruzada (Cunha Neto y col, 1995). El hexapéptido responsable de la reactividad cruzada también era reconocido por la mayoría de los sueros de pacientes que presentaban cardiomiopatía chagásica crónica pero no por los de pacientes asintomáticos (Cunha Neto y col, 1995). En conjunto, estos resultados sugieren un papel importante de la proteína B13 de *T. cruzi* en la patogénesis de las lesiones cardíacas en la enfermedad de Chagas crónica y poseen la relevancia de haber utilizado muestras humanas.

El mismo grupo de investigadores, estudió el repertorio V α y V β del receptor de células T (TCR) en linfocitos infiltrantes de lesiones cardíacas en muestras de pacientes, encontrando que el repertorio V α era más restringido que el V β (Cunha Neto y col, 1994). Posteriormente, Sunnemark y col (1998) utilizando un modelo murino que reproduce las características de la patología cardíaca en humanos (CBA/HJ-Tulahué) demostraron que

existía sobreexpresión de los segmentos TCRV β 8.2 y TCRV β 8.3 en linfocitos infiltrantes de corazón en ausencia aparente de parásitos mientras que no encontraron alteraciones en el repertorio de linfocitos de bazo en animales infectados. El estudio del polimorfismo del tamaño de segmentos CDR3 (zona hipervariable del TCR involucrada en el reconocimiento antigénico) para las familias V β 8.2 y 8.3 mostró distribuciones Gaussianas -indicativas de policlonalidad- en bazo de animales controles e infectados mientras que el patrón en corazones de animales infectados reveló un perfil no-gaussiano. Estos resultados refuerzan la noción que para dilucidar los mecanismos involucrados en la patología chagásica crónica los mismos deben estudiarse en el/los órgano/s blanco de daño. Además, la sobre-representación de determinados segmentos V β asociada al perfil alterado de distribución del tamaño del CDR3 en el sitio de lesión son coherentes con hallazgos similares en otras enfermedades mediadas por procesos autoinmunes (Kim y col, 1998 a y b). Cabe destacar que los autores sostienen que no detectaron parásitos en corazón ni en ningún otro órgano de los animales crónicamente infectados, aunque no indican la metodología utilizada para su búsqueda.

5. c- Hipótesis no autoinmunes

Un punto de vista alternativo a la hipótesis autoinmune es el que sostiene que *T. cruzi* persiste en el huésped infectado –particularmente en los sitios de lesión- y que esta persistencia parasitaria es suficiente para el desarrollo de la enfermedad sin necesidad del proceso autoinmune (Tarleton y Zhang, 1999).

Con el advenimiento de técnicas más sensibles como inmunohistoquímica, hibridación *in situ* o PCR para detectar la presencia del parásito en los órganos blanco de daño en infecciones crónicas, diversos autores comunicaron correlaciones entre la presencia de parásitos y daño tisular. Por ejemplo, en ratones C57Bl/6J infectados con la cepa Brazil se hallaron parásitos en músculo esquelético pero no en corazón mientras que animales C3H/HeJ infectados con la cepa Sylvio X10/4 los parásitos persistían en corazón pero no en músculo esquelético. En ambos modelos de infección, la lesión inflamatoria crónica sólo se manifiesta en los órganos donde se encontraron parásitos (Zhang y Tarleton, 1999). Jones y col (1993) comunicaron que ADN de *T. cruzi* fue hallado en autopsias de corazón de

pacientes diagnosticados con cardiomiopatía chagásica crónica pero no en muestras equivalentes de pacientes con serología positiva sin cardiopatía. Hallazgos similares en esófago fueron comunicados por Vago y col (1996).

Por otro lado, si el principal mecanismo inmunopatogénico de la enfermedad de Chagas fuera autoinmunitario, la inmunosupresión durante el estadio crónico debería reducir la severidad de la enfermedad. Sin embargo, en pacientes con tratamientos inmunosupresores para prevenir rechazos de transplantes o en pacientes con SIDA que cursan infección crónica por *T. cruzi*, se ha observado reactivación de la infección (Rosenberg y col, 1992; Rocha y col, 1994; Almeida y col, 1996). No obstante la mayoría de las reactivaciones dan como resultado cuadros de meningoencefalitis que no se relacionan con las patologías cardíaca o digestiva que se ven más frecuentemente en pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, guardarían relación si el órgano blanco del parásito fuera –también– el sistema nervioso, al menos en los pacientes que presentan reactivaciones.

En el modelo murino pudo comprobarse que asociado al aumento de la carga parasitaria como consecuencia de la inmunodepresión se observa un incremento de la inflamación en corazón y músculo esquelético (Andrade y col, 1987; Tarleton y col, 1994; Tarleton y col, 1996). Los autores interpretan esta paradoja como el resultado residual de la respuesta inmune del huésped que es incapaz de controlar el crecimiento de la carga parasitaria pero que es más dramática en intensidad y potencialmente más dañina por mecanismos que tienden a compensar el bloqueo de un brazo de la respuesta inmune (Tarleton, 2001). Excepciones al hecho de que bloqueando la respuesta inmune la severidad de la enfermedad de Chagas empeora se han comunicado en ratones XID (deficientes en células B CD5+) los cuales son capaces de controlar más eficientemente la carga parasitaria en la fase aguda y presentan infiltrados inflamatorios menos severos. Ya que éstos animales presentan una respuesta Th1 más potente, una interpretación de estos resultados es que una respuesta de tipo Th2 es crucial en el desarrollo de los infiltrados inflamatorios (Minoprio y col, 1993). En el mismo sentido se ha demostrado que ratones *Stat6 KO* que carecen de células Th2 maduras son altamente resistentes a la infección por *T. cruzi*, presentan signos de enfermedad menos severos en la fase crónica y menor carga parasitaria en músculo esquelético y corazón (Tarleton y col, 2000).

Otro modelo interesante que apoya la hipótesis no-autoinmune es el que mostró que corazones transplantados en la oreja de animales crónicamente infectados persisten funcionales y sin signos de infección o enfermedad por más de un año en el animal receptor (Tarleton y col, 1997). Por el contrario, si los corazones son transplantados durante el período agudo (cuando hay parásitos circulantes) los mismos se infectan y presentan infiltrados inflamatorios. Los autores sostienen que la falta de parasitismo en los corazones transplantados, a pesar de la persistencia parasitaria en el huésped, es el resultado de la respuesta inmune que confina la infección a tejidos específicos (Tarleton y col, 1997). En contraposición con estos resultados, Ribeiro dos Santos y col (1992) mostraron que el transplante de corazones singeneicos en ratones crónicamente infectados eran rechazados por mecanismos autoinmunes.

A pesar de sostener que esencialmente todos los aspectos de la enfermedad de Chagas están ligados a la persistencia parasitaria en el huésped crónicamente infectado, quienes sostienen la hipótesis no autoinmune no niegan la existencia de una importante respuesta autoinmunitaria que consideran importante en el desarrollo de la enfermedad (Tarleton y Zhang, 1999). Los autores respaldan la hipótesis del “peligro” en la cual la presencia de señales de peligro (en este caso la infección por *T. cruzi*), potenciaría la expresión de moléculas coestimuladoras que podrían activar células T anti- *T. cruzi* y anti- propias.

Hipótesis: *Poblaciones de T. cruzi con diferencias en morfología, tropismo, virulencia, inmunogenicidad, etc., como son las cepas RA y CA-I, tienen capacidad para inducir daño por mecanismos diferentes y en distintos tejidos blanco; parte de este daño está mediado por procesos autoinmunes. El conocimiento de los factores y mecanismos inmunológicos involucrados en el proceso patogénico desencadenado por la infección con ambas cepas de T. cruzi, permitiría evaluar la factibilidad de aplicar nuevas estrategias para abordar el tratamiento y/o prevención de esta parasitosis.*

Objetivo General

Estudiar los mecanismos inmunológicos involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Chagas a nivel de sistema nervioso periférico (arco médula-nervio-músculo). Se utilizará como modelo de infección experimental la asociación ratón C3H/HeN y dos cepas de *T. cruzi* (RA y CA-I) con tropismo tisular diferencial.

Objetivos Particulares

A. Participación de factores humorales en patogenicidad

1. Determinar la reactividad de sueros de ratones infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi* frente a antígenos de *T. cruzi* y de sistema nervioso del huésped murino.
2. Estudiar el efecto en la conductividad del nervio ciático y en la producción de daño histológico de la transferencia a receptores singeneicos de sueros de animales infectados con las cepas RA y CA-I. Determinar si existe alguna relación con la detección de antígenos propios.
3. En caso de encontrar alteraciones electrofisiológicas y/o histológicas, determinar qué componente/s del suero están involucrados.

B. Participación de LT en la producción de daño:

1. Caracterizar la expresión de cadenas V β del TCR en linfocitos infiltrantes de lesiones, en ratones infectados con ambas cepas de *T. cruzi*. De encontrarse segmentos TCRV β sobreexpresados en tejidos blanco de daño,
2. Analizar el polimorfismo de secuencia del CDR3 en los segmentos sobreexpresados.
3. Estudiar la producción de citoquinas y la presencia de parásitos en los órganos en que se caracterizó la expresión de segmentos TCR V β .

Materiales y Métodos

Animales

Los animales usados en la presente Tesis fueron criados en el bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina (UBA). Para el mantenimiento de rutina de las cepas de *Trypanosoma cruzi* se utilizaron ratones machos exocriados Rockland ó CF1 de 21-25 días de edad. Para los protocolos de infección experimental se emplearon ratones machos endocriados C3H/HeN (H-2^k; Mls-1^{b2a}) de 3-6 semanas según requerimientos. Para los estudios de transferencia se utilizaron ratones de la misma cepa de 2,5 - 3 meses de edad. En todos los casos los animales fueron mantenidos en grupos de 4-6 animales por jaula, con agua y alimento balanceado *ad libitum*.

Cepas de *T. cruzi*, mantenimiento

La cepa RA, aislada de un caso agudo de enfermedad de Chagas (González Cappa y col, 1981), es mantenida por pasajes semanales por inoculación de 2×10^5 tripomastigotes circulantes (trip) por vía intraperitoneal (ip). La cepa CA-I, aislada de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica (González Cappa y col, 1980), se mantiene por pasaje cada 30-45 días, por inoculación ip de 2×10^5 trip.

Como rutina en nuestro laboratorio, los animales se sacrifican mediante anestesia con eter etílico en el pico de la parasitemia y se obtiene sangre por punción cardíaca, en esterilidad. Luego de la dilución (generalmente 1/10) de una alícuota de la sangre obtenida y la lisis de glóbulos rojos, se realiza el recuento de parásitos en cámara de Neubauer. Posteriormente, la sangre se diluye a la concentración deseada en buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 suplementado con 10% de suero homólogo (PBS-suero) -para proteger a los parásitos de la lisis espontánea luego de grandes diluciones- que se utiliza para infectar animales de pasajes ó de experimentación (Katzin y col, 1977; Müller y González Cappa, 1985).

Infección de ratones de ensayos experimentales

Se inocularon 10-50 trip de la cepa RA por vía intradermopltar (idp) diluidos en PBS-suero a ratones de 4-6 semanas ó 1×10^5 trip en PBS-suero de la cepa CA-I por vía ip a

ratones de 3-4 semanas. Estas vías e inóculos garantizan una alta tasa de infección y, para el caso de RA, evitan la alta mortalidad de los ratones observada durante la fase aguda cuando no media tratamiento farmacológico (Marín y col, 1993). Estos inóculos, además, inducen una respuesta inmune humoral óptima contra el estadio circulante del parásito (Müller y col, 1987). La infección fue confirmada por métodos directos (gota fresca o microhematocrito) a los 10- 15 días post-infección (dpi) (Freilij y col, 1983). Los animales en los que no se detectaron parásitos circulantes fueron excluidos de los protocolos experimentales.

A-Participación de anticuerpos en la producción de daño

A.1- Sueros

Animales aguda y crónicamente infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi* fueron sacrificados a los 15, 120 (4 mpi) y 270 (9 mpi) dpi. Sangre obtenida por punción cardíaca se incubó 30 min a 37°C y 30 min a 4°C para la formación y retracción del coágulo, que luego fue separado por centrifugación. Los sueros obtenidos se conservaron, fraccionados, a -20°C. Sueros de animales no infectados, de igual sexo y edad que los infectados, se utilizaron como controles.

Se estudió en los sueros la presencia de anticuerpos (Ac) frente a antígenos (Ag) de *T. cruzi* y su reactividad *in vitro* frente a Ag conformacionales de nervio ciático y músculo esquelético. En una segunda etapa, los sueros previamente caracterizados, fueron inyectados en el epineuro de animales receptores normales en los cuales se evaluaron parámetros electrofisiológicos de conductividad nerviosa y se realizaron estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos (IHQ). Mezclas de los mismos sueros se utilizaron para purificar IgG.

A. 2- Purificación de IgG

IgG total fue purificada a partir de conjuntos de sueros de animales infectados o de controles utilizando columnas de afinidad de proteína G (Pharmacia). Los sueros fueron diluidos 1:1 con buffer de pegado (fosfato de sodio 20mM, pH 7,0) y filtrados en membranas con poro de 0,45µm. Luego de equilibrar la columna con 3 ml de buffer de pegado se aplicó la muestra. Se lavó la columna con 5 ml de buffer de pegado y se eluyó con 5 ml de buffer de elución (glicina-HCl 0,1M, pH 2,8). Las fracciones de elución (1 ml) se colectaron en tubos conteniendo 20µl de buffer de neutralización (Tris-HCl 1M, pH 9). La presencia y concentración de IgG (generalmente eluída en el tubo 2) se determinó por absorbancia a 280 nm y su pureza en geles de poliacrilamida 15%. La IgG obtenida fue desalada por diálisis, liofilizada y resuspendida a una concentración final de 4 mg/ml. La reactividad hacia Ag de nervio, luego de la purificación, se constató por IFI como se describe más adelante.

A. 3- Obtención de antígenos parasitarios liberados (AgPL)

Se realizó según lo descripto por Jazin y col, 1991. Brevemente, ratones infectados con la cepa RA fueron sangrados a blanco en el pico de parasitemia y la sangre (3 ml) mezclada con 5 ml de PBS- 1% BSA. El material fue centrifugado 5 min a 300g para bajar los glóbulos rojos, se dejó reposar 10 min y se separó el sobrenadante conteniendo parásitos. Se realizaron 2 lavados con PBS-1%BSA, el sedimento fue resuspendido en 700µl de PBS-1%BSA y se incubó 1 hr a 37°C. Se centrifugó la muestra 15 min a 9000 rpm y el sobrenadante conteniendo los Ag liberados por los parásitos (AgPL) fue separado.

A. 4- Serología anti- *T. cruzi*

La reactividad de los sueros frente a Ag de *T. cruzi* se determinó utilizando la técnica de ELISA, independientemente de la confirmación de la infección por métodos directos. Placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 15µg de homogenato total de epimastigotes

de *T. cruzi* en 50µl de buffer carbonato pH 9,6, incubándolas toda la noche a 4°C. Los sitios libres de las placas fueron bloqueados con PBS-Tween 0,01%- Leche descremada 5% (PBS-T-L), durante 1 hr a 37°C. Los sueros problemas fueron incubados en diluciones seriadas 1/50-1/1600 durante 2 hr a 37°C y luego de 5 lavados con PBS-Tween se agregó el Ac secundario (anti-IgG de ratón) conjugado con peroxidasa en dilución 1/2000 en PBS-T-L. Se incubó durante 1 hr a 37°C, se realizaron los lavados correspondientes y se procedió al revelado con 4 mg de OPD en 10 ml buffer citrato pH 5,0-5,2 en presencia de 5µl de agua oxigenada, por placa. La reacción fue cortada por el agregado de H₂SO₄ 1N y los valores de densidad óptica de los distintos sueros fueron determinados en un lector de placas de ELISA a 492 nm. Se investigaron posibles diferencias en la absorbancia para una determinada dilución entre sueros controles e infectados o entre sueros de animales infectados con distintas cepas de *T. cruzi* utilizando la prueba estadística *t* de Student.

A. 5- Reactividad de sueros frente a antígenos conformacionales murinos

Músculo esquelético y nervio ciático de animales normales fueron extraídos y congelados inmediatamente en baño de isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Los tejidos fueron montados en OCT y cortados en criostato en secciones de 4 µm. Las secciones de tejidos fueron secadas y fijadas durante 10 min en acetona fría (4°C) y se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a -20°C una semana como máximo. Los sueros de animales infectados y controles (dil 1:50) se enfrentaron a los tejidos para buscar Ac autorreactivos IgG y/o IgM mediante la técnica de inmunofluorescencia, utilizando Ac secundarios conjugados con fluoresceína (FITC) (cabra anti- ratón IgG ó cabra anti-ratón IgM, dil: 1:40). La prueba de proporciones múltiples pareadas fue utilizada para estudiar posibles diferencias de reactividad entre sueros de animales infectados con una u otra cepa. De acuerdo a la reactividad (o no) hacia Ag conformacionales los sueros fueron definidos como Ne+ (reactivos contra nervio) ó Ne- (no reactivos contra nervio).

A. 6- Ensayos de transferencia

Ratones singeneicos (C3H/HeN) de 2,5-3 meses de edad y 27-33 gr fueron utilizados como receptores de trip de *T. cruzi*, sueros de animales infectados o controles, IgG purificadas ó AgPL. Los animales receptores fueron anestesiados con tri-bromoetanol 2% (0,15 ml/10 gr peso) y, luego de rasurar el pelo de la pata posterior derecha del animal y esterilizar la zona correspondiente con alcohol iodado, se realizó una pequeña incisión en la piel y músculo evitando cortar la vascularización. El nervio ciático derecho expuesto fue inyectado bajo lupa estereoscópica en el epineuro con 30 µl utilizando una jeringa con aguja 30 gauge, según lo descrito por Said y col (1985). La herida de los animales fue cerrada con hilo de sutura quirúrgico de lino y desinfectada con alcohol iodado. Se constató la recuperación de la anestesia de los animales y la buena movilidad de la pata posterior derecha. A los 4-17 días post-inyección (dpy) se realizaron estudios electrofisiológicos e histopatológicos en los receptores, luego de constatar la ausencia de abscesos por infecciones bacterianas.

A. 6. 1- Inyección de sueros: Sueros obtenidos de animales aguda o crónicamente infectados con las cepas RA ó CA-I de *T. cruzi*, cuya reactividad hacia Ag conformacionales de nervio ciático había sido previamente caracterizada por IFI, se transfirieron en el epineuro del nervio ciático derecho de animales singeneicos receptores. Para esta parte del trabajo, se seleccionaron 13 sueros de animales infectados con la cepa RA (8 Ne⁺, 5 Ne⁻) y 11 sueros de animales infectados con la cepa CA-I (7 Ne⁺, 4 Ne⁻). Cada receptor fue transferido con 30 µl de un suero obtenido de animales individuales. Los controles fueron inyectados con suero de animales no infectados.

Para los estudios electrofisiológicos se inyectaron 9 sueros RA, 8 sueros CA-I y 6 sueros controles. Se realizaron 2 experimentos independientes utilizando los mismos sueros y condiciones. Para los estudios de estructura de mielina, histopatológicos y de búsqueda de depósitos de Ig y complemento en nervios, se inyectaron 10 sueros Ne⁺ (7 RA, 3 CA-I) y 3 sueros controles en ratones individuales por triplicado. Un grupo adicional de animales fue inyectado con 4 sueros RA/Ne⁺, 2 CA-I/Ne⁺ y un suero control para investigar la presencia de ADN de *T. cruzi* en los nervios.

A. 6. 2- Inyección de parásitos: 100- 200 μ l de sangre, obtenida de animales infectados en el pico de parasitemia, fueron diluïdos en concentración final de 2000 trip/ml en PBS-10% suero homólogo. Los receptores se inyectaron con 30 μ l (60 trip) en el nervio ciático como se indica arriba. Los animales fueron seguidos parasitológicamente por MHT para detectar parasitemia (Freilij y col, 1983). Para los estudios electrofisiológicos se inyectaron 12 animales con trip CA-I y 14 con trip RA; los mismos fueron estudiados en grupos de 8-10 animales a los 4, 10 y 17 dpy. Animales receptores controles inyectados con PBS-10% suero homólogo de ratón, fueron evaluados en grupos de 5 en cada tiempo estudiado. Un lote adicional de 24 ratones fue inyectado y estudiado en grupos de 8 a los 4, 10 y 17 dpy. En cada tiempo, 4 animales receptores se utilizaron para estudios histopatológicos, 2 para estructura de mielina y 2 para detección de ADN de *T. cruzi* en nervios.

A. 6. 3- Transferencia de IgG y antígenos parasitarios: 30 μ l de IgG purificada, suero depletado de IgG ó suero depletado de IgG reconstituido con IgG purificada fueron transferidos a los animales receptores. Un grupo adicional de animales fue transferido con AgPL.

A. 7- Estudios en animales receptores

Los animales receptores fueron anestesiados con tribromoetanol 2% ó sacrificados para realizar estudios electrofisiológicos ó histopatológicos, respectivamente, entre 4 y 17 días luego de la transferencia de sueros, trip, IgG ó AgPL.

A. 7. 1- Conductividad del nervio ciático: El nervio ciático de los animales receptores (anestesiados) fue expuesto bajo lupa y montado en un hemitubo de teflón conteniendo 2 electrodos de estimulación, 2 electrodos de registro y una tierra. Se tuvo especial cuidado de colocar los electrodos de estimulación antes del sitio de inyección y los de registro luego del mismo. Se administraron pulsos rectangulares de voltaje de 0,5 ms de duración a una frecuencia de 0,2 Hz desde un estimulador S5 Grass. Mediante un amplificador de bajo ruido, se registró el potencial de acción extracelular del nervio ciático (PAN), el cual se

almacenó en un osciloscopio (Figura A). Se determinaron la latencia, amplitud, número de fases y duración del PAN en los nervios inyectados y no inyectados (Losavio y col, 1993). Los diversos parámetros del PAN registrados aportan datos sobre la velocidad de conducción y el estado de la mielina (latencia), el número de axones que conducen en un determinado nervio (amplitud) y/o si todos los axones presentes conducen en forma sincrónica (duración y número de fases). Fueron registradas –al menos- 3 mediciones para cada nervio ciático en cada animal receptor. Los valores absolutos del PAN se utilizaron para calcular el porcentaje de respuesta obtenida en el nervio derecho inyectado en relación con la respuesta obtenida en el nervio contralateral izquierdo no inyectado, para cada receptor.

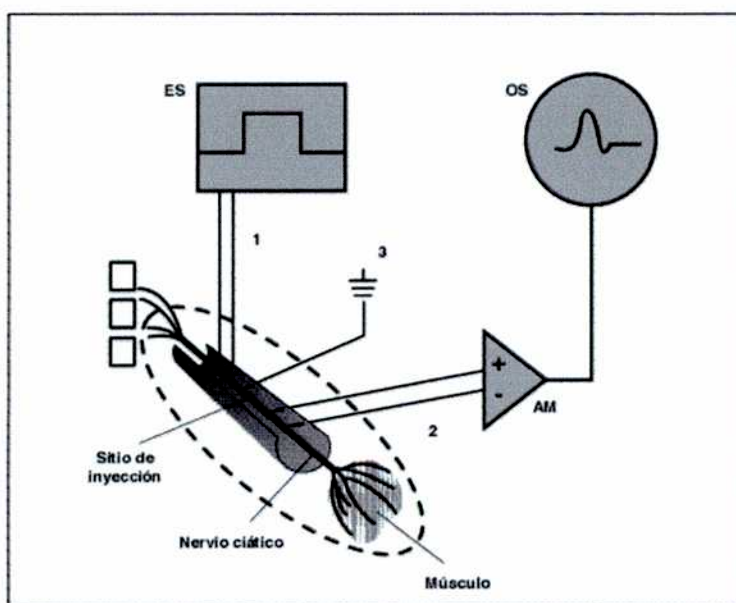


Figura A. Esquema representando el nervio ciático montado *in situ* para estudios electrofisiológicos. ES: estimulador; OS: osciloscopio; AM: amplificador. 1: electrodos de estimulación; 2: electrodos de registro; 3: tierra.

Se realizaron estudios preliminares a los 2, 3, 4 y 7 dpy en animales inyectados con suero normal y PBS con el fin de fijar el tiempo óptimo py de registro de los diferentes parámetros del PAN. El mismo quedó establecido en 4 dpy, siendo éste el menor tiempo en que no se registraban diferencias en los valores de latencia, duración, amplitud y número de fases entre el nervio inyectado y no inyectado. Las diferencias encontradas a tiempos menores, se atribuyeron al trauma post-inyección. Los animales inyectados con trip también fueron estudiados a los 10 y 17 dpy.

Se utilizó la prueba de ANOVA (Turkey post-test) para analizar los valores del PAN obtenidos en animales controles y grupos experimentales utilizando el software Graph Pad Prism.

A. 7. 2- Histopatología y depósitos de factores de suero: Se extrajeron los nervios inyectados y los contralaterales no inyectados de los animales receptores de suero y de trip. Los nervios de un grupo de receptores se fijaron en tetróxido de osmio, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 5 μm . Se realizaron estudios para analizar la estructura de mielina.

Los nervios obtenidos de otro grupo de ratones se congelaron en nitrógeno líquido y cortaron en secciones de 4-6 μm con criostato (IEC, Damon, USA). Cortes secuenciales longitudinales fueron alternativamente usados para estudios histológicos e IHQ. Se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina (H&E) y luxol fast-blue. Los infiltrados evidenciados por H&E se cuantificaron empleando un analizador de imágenes Zidas (Zeiss) y se categorizaron como leves (pequeños infiltrados aislados comprometiendo una superficie tisular menor del 15%), moderados (infiltrados sin signos de fibrosis, comprometiendo 15-50% de la sección tisular) o intensos (>50% superficie tisular).

La búsqueda de depósitos de IgG, IgM ó C3 *ex vivo* reactivos con estructuras de nervio en animales receptores de suero, se realizó por incubación de las secciones de nervio con Ac específicos utilizando los siguientes protocolos:

Detección de IgG

Bloqueo: PBS-suero normal de cabra 5%

Ac: anti-IgG de ratón (hecho en cabra), biotinilado (1/50)

Detección de IgM ó C3

Bloqueo: PBS- suero normal de conejo 5%

1^{er} Ac: anti-C3 (1/100) de ratón ó anti- IgM (1/50) de ratón (hechos en cabra)

2^{do} Ac: anti- IgG de cabra (hecho en conejo), biotinilado

En todos los casos las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min y luego de cada incubación con los Ac específicos se realizaron tres lavados de 5 min en PBS, para eliminar el Ac excedente. El revelado se realizó mediante incubación por 30 min con ExtraAvidin-FITC (1/200). Las secciones tisulares se montaron con Antifade (Molecular Probes) y la señal se detectó con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiolab.

A. 7. 3- Detección de ADN parasitario en nervios de animales receptores: Se extrajo el ADN genómico de los nervios de animales transferidos con trip ó con sueros utilizando el kit de purificación Wizard genomic (Promega) según instrucciones del fabricante. El ADN se amplificó por PCR utilizando *primers* específicos para la enzima hipoxantina-guanina fosfo-ribosil-transferasa (HGPRT) de *T. cruzi* que producen un amplicón de 412 pb tanto a partir de DNA como RNA parasitario (Murta y col, 1998). Los productos obtenidos se visulizaron en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio.

Para poner a punto la técnica, se extrajo ADN y ARN por métodos convencionales a partir de epimastigotes y amastigotes de cultivo y se evaluaron distintos ciclos de amplificación y distintas concentraciones de MgCl₂ para diferentes diluciones de material parasitario. El ciclo de amplificación quedó establecido según las siguientes condiciones: 94°C, 4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C, 1min; 55°C 1min; 72°C 1 min. La concentración óptima de MgCl₂ fue de 2,5mM.

B- Participación de LT en la producción de daño

B. 1- Caracterización de las cadenas V β del receptor de células T (TCR)

Se realizó por la técnica de RT-PCR, seguida de dot-blot e hibridación con una sonda marcada a partir de ARN total extraído de tejidos y linfocitos de sangre periférica de animales crónicamente infectados con ambas cepas de *T. cruzi* y controles normales (Panzara y col; 1992).

B. 1. 1- Extracción de tejidos

Animales crónicamente infectados (4-9 mpi) fueron sacrificados por anestesia con éter para la obtención de tejidos y linfocitos de sangre periférica. Animales no infectados de la misma edad y sexo, fueron utilizados como controles. Se obtuvieron en condiciones de esterilidad y libres de RNAsas los siguientes tejidos: nervio ciático, médula espinal, corazón, músculo esquelético, bazo y sangre periférica. Se obtuvieron también bazos de animales no infectados de la cepa Balb/c (H-2^d, I-E⁺, *Mls-1*^b) y Balb/c línea 10, gentilmente cedidos por la Dra. I. Piazzón (Academia Nacional de Medicina). Los tejidos fueron lavados en NaCl 0,9% preparado con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y almacenados en nitrógeno líquido (N₂) hasta su utilización. A partir de la sangre periférica se procedió a purificar linfocitos.

Purificación de linfocitos: Los ratones fueron sangrados a blanco por punción cardíaca (aproximadamente 1,3 ml de sangre/ratón) con anticoagulante (EDTA 2,7%). La sangre fue diluída con NaCl 0,9% (1+3) y sembrada en un gradiente de Ficoll-Isopaque de densidad final 1,077 g/ml (24 partes de Ficoll 9% + 10 partes de amidotriazoato de meglumina $\delta=1,2$ g/ml). El gradiente fue centrifugado a 400g, 15 min. La interfase fue retirada y se realizó un recuento de linfocitos viables con Trypan blue (concentración final 0,33%). Los linfocitos purificados ($4,8 \times 10^5$ - $4,4 \times 10^6$ linfocitos por ratón) fueron lavados por centrifugación, se realizó un recuento final y se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

B. 1. 2- Aislamiento de ARN

Linfocitos purificados ó tejidos (50-100 mg) se homogeneizaron en 1 ml de TRI Reagent (Sigma). El homogenato se centrifugó 10 min (12000 g, 4°C) para separar el material insoluble y minimizar la contaminación por ADN. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se incubó 5 min a temperatura ambiente (TA). Se agregó 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 15 min a TA. Se centrifugó (4°C, 15 min, 12000 g) y se separó la fase acuosa superior a la cual se le agregó 0,5 ml de isopropanol. Se incubó 10 min (TA), se centrifugó (4°C, 10 min), se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 ml de etanol 75% frío. Se centrifugó (4°C, 5 min, 7500 g) y se secó el pellet por 10-15 min en baño seco. El ARN obtenido se resuspendió en distintos volúmenes -según el tejido- de agua tratada con DEPC (bazo: 200µl, corazón: 100µl, médula: 50µl, nervio: 22µl, músculo: 50µl), incubando 10-15 min a 55-60°C y mezclando por pipeteo ocasionalmente. La determinación de la cantidad de ARN obtenida, así como la pureza y conservación del mismo, se realizó utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-600 midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm y realizando el cociente de las mismas. Preparaciones finales de ARN con una relación $260/280 \geq 1,7$ se consideran libres de ADN y proteínas. Las muestras de ARN obtenidas se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

B. 1. 3- Transcripción reversa (RT)

A partir de 2,5 µg de ARN purificado, se realizó la preparación de ADN “copia” (cADN) utilizando como *primers* hexanucleótidos (N6) en concentración final 1µM, buffer RT (250 mM Tris-HCl -pH 8,3-, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM DTT), dNTPs (0,5mM final), 200U de enzima transcriptasa reversa M-MLV (Gibco) y agua estéril libre de RNAsa y DNAsa para un volumen final de 20 µl. Se realizaron al menos 2 reacciones de RT para cada tejido. Primero se incubó la mezcla de ARN, *primers* y agua durante 10 min a 70°C, se colocó el tubo rápidamente en hielo, se agregaron el buffer y los dNTPs, se incubó 5 min a 42°C, se agregó la enzima y se incubó 50 min a 42°C, -seguidos por 5 min a 95°C para inactivar la enzima- y se colocó el tubo en hielo. Como controles negativos, para cada muestra, se realizaron reacciones de RT colocando todos los reactivos en ausencia de

enzima (control de contaminación por ADN) y como controles negativos de contaminación de reactivos, reacciones sin ARN.

B. 1. 4- Amplificación del cADN por PCR

Para la amplificación de las distintas cadenas V β , cada mezcla de reacción fue incubada con dos *primers*: uno común a todas las reacciones correspondiente a la región constante del TCR C β (*primer* 3', down ó *antisentido*) y el otro correspondiente a una de las 21 familias V β (*primer* 5', up ó *sentido*). Las secuencias de los *primers* se detallan en la Tabla A (Nitta y col, 1991). Los productos de amplificación utilizando *primers* C β y V β tienen un tamaño esperado de 360- 420 pares de bases (pb) salvo para las cadenas V β 10, V β 12 y V β 13 que son más cortas (290, 190 y 260 pb, respectivamente).

La mezcla de reacción de PCR contiene: 1 μ l de cDNA, dNTPs (0,2mM final), *primer* C β (0,5 μ M) (Byodinamics), *primer* V β correspondiente (0,5 μ M) (Byodinamics), 2 μ l de buffer PCR 10X (500mM KCl, 100mM Tris-HCl -pH:9-, 1%Tritón X-100), 0,4U de *Taq* polimerasa (Promega), MgCl₂ (en concentración adecuada según el *primer* V β usado), agua estéril libre de DNAsa y RNAsa (para 20 μ l finales) y aceite mineral. Las condiciones de amplificación fueron 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de: 95°C, 1 min; 55°C, 1 min y 72°C, 1 min; seguidos por 10 min a 72°C y ligados con un programa a 4°C. En todos los experimentos se incluyeron tubos donde se amplificó actina murina como control positivo (5'catcgtgggccgctctaggcaa3'; 5'ccggccagccaagtccagac gc3') y controles negativos ("cADN" de RT negativa).

Inmediatamente después de la preparación del cADN -y antes de realizar la amplificación de las cadenas V β del TCR- se realizó para cada tejido la amplificación por PCR de actina utilizando el mismo perfil de ciclado que el establecido para las cadenas del TCR. La detección del producto se realizó en geles de poliacrilamida 6% o agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio.

Tabla A. *Primers* utilizados para amplificar las cadenas β del TCR murino por PCR.

<i>PRIMER</i>	<i>SECUENCIA</i>
V β 1 (23 mer)	5' atc taa tcc tgg gaa gag caa at 3'
V β 2 (23 mer)	5' ggc gtc tgg tac cac gtg gtc aa 3'
V β 3 (23 mer)	5' gtg aaa ggg caa gga caa aaa gc 3'
V β 4 (22 mer)	5' gat atg cga aca gta tct agg c 3'
V β 5 (23 mer)	5' aca taa tca aag gaa agg gag aa 3'
V β 6 (23 mer)	5' tcc tga ttg gtc agg aag ggc aa 3'
V β 7 (23 mer)	5' tac ctg atc aaa aga atg gga ga 3'
V β 8.1 (23 mer)	5' ata acc atg act ata tgt act gg 3'
V β 8.2 (23 mer)	5' ata acc aca aca aca tgt act gg 3'
V β 8.3 (23 mer)	5' ata gcc aca act aca tgt act gg 3'
V β 9 (23 mer)	5' agc ttg caa gag ttg gaa aac ca 3'
V β 10 (23 mer)	5' gat tat gtt tag cta caa taa ta 3'
V β 11 (23 mer)	5' aca agg tga cag gga agg gac aa 3'
V β 12 (23 mer)	5' acc tac aga acc caa gga ctc ag 3'
V β 13 (23 mer)	5' cag ttg ccc tcg gat cga ttt tc 3'
V β 14 (23 mer)	5' gcc gag atc aag gct gtg ggc ag 3'
V β 15 (23 mer)	5' aga acc atc tgt aag agt gga ac 3'
V β 16 (23 mer)	5' cat caa ata ata gat atg ggg ca 3'
V β 17 (23 mer)	5' gta gtc ctg aaa aag ggc aca ct 3'
V β 18 (22 mer)	5' cat ctg tca aag tgg cac ttc a 3'
V β 19 (22 mer)	5' ccc ata aac gga cat agt tac g 3'
C β (21 mer)	5' gcc aag cac acg agg gta gcc 3'

B. 1. 5- Marcación de sonda

La detección de las cadenas amplificadas por PCR, se realizó por dot-blot utilizando una sonda interna correspondiente a la región constante C β (5'-ttgatggctcaacaaggagacc-3'). Dicha sonda fue primero marcada en su extremo 3' con digoxigenina (DIG) utilizando un

kit de marcación comercial (Boehringer Mannheim) y el protocolo que se detalla a continuación. Se mezclaron en un tubo en hielo 100 pmoles de la sonda, buffer de marcado (tailing buffer, 4 μ l), solución de CoCl₂ (4 μ l), solución DIG-ddUTP (1 μ l), enzima transferasa terminal (1 μ l) y agua para volumen final de 20 μ l. La mezcla se incubó 15 min a 37°C y se pasó a hielo. Se agregaron 2 μ l de una solución preparada con 1 μ l de glicógeno y 200 μ l de EDTA 0,2 mM pH 8,0 para detener la reacción. El oligo marcado se precipitó con 2,5 μ l de LiCl 4M y 75 μ l de etanol 100% frío incubándolo 30 min a -70°C. Se centrifugó 10 min a 12000 g, se lavó el sedimento con 50 μ l de etanol 75% frío y se volvió a centrifugar 10 min a 13000 g. El sedimento se secó en vacío y se disolvió en 40 μ l de agua destilada estéril. En paralelo con la reacción de marcación de la sonda de interés, se realizó la marcación de un oligonucleótido control. La correcta marcación de la sonda se verificó por corrida en geles de poliacrilamida 20% de los oligonucleótidos marcados (control y C β) y no marcados. Se confirmó la marcación por el retraso en la migración de las sondas marcadas respecto de las no marcadas en los geles luego de la tinción con plata. Además, se constató el correcto funcionamiento de las mismas por hibridización de las sondas control y C β marcadas con ADN control y productos de PCR de distintas cadenas V β amplificadas por PCR (previamente visualizados en geles), respectivamente. Este último procedimiento se utilizó también para poner a punto las condiciones de hibridización para la detección de productos de PCR.

B. 1. 6- Detección del producto

La puesta a punto de las condiciones de hibridización y detección del producto, dio como resultado el protocolo que se detalla en el párrafo siguiente. La composición de las soluciones utilizadas se detalla en el Anexo de Materiales y Métodos, al final de esta sección.

Los productos de amplificación fueron diluidos (4+9) en buffer de dilución de ADN y 1 μ l fue sembrado en membranas cargadas positivamente (Boehringer Mannheim). El ADN fue fijado a la membrana por *crosslinking* con UV a 254 nm (3 min) y los filtros prehibridizados 6hr a 68°C con solución de hibridización. Posteriormente, se realizó la

hibridización con 25 pmol/ml de la sonda marcada con DIG en solución de hibridización conteniendo esperma de salmón 50µg/ml a 54°C, toda la noche. Se realizaron 2 lavados de 5 min cada uno con al menos 50 ml de 2X SSC, 0,1% SDS a TA y 2 lavados de 15 min cada uno con 0,1% SSC, 0,1% SDS a temperatura de hibridización (54°C). Las membranas fueron luego lavadas con buffer lavado de detección durante 5 min e incubadas 30 min en buffer de bloqueo de detección. Se realizó seguidamente la incubación con 20 ml de solución de bloqueo conteniendo Ac anti-DIG acoplado con fosfatasa alcalina (dil 1/5000) durante 30 min en bolsas selladas y con agitación constante a TA. Se realizaron 2 lavados de 15 min con buffer lavado de detección (100 ml) y se procedió a equilibrar la membrana 2-5 min con 20 ml de buffer detección. Se incubaron las membranas en bolsa plástica sellada por 5 min con CSPD 1/100 en buffer detección, se escurrieron las membranas sobre papel de filtro y se colocaron en nueva bolsa plástica que se incubó 15 min a 37°C para potenciar la reacción de quimioluminiscencia. Se expusieron luego las membranas sobre placas de autorradiografía (15 min, TA) y se procedió al revelado y fijado de las mismas.

B. 1. 7- Determinación de uso relativo de cadenas Vβ del TCR

La intensidad de las señales de los productos de PCR hibridizados fue medida con un scanner Eagle Eye (Stratagene) y analizadas con el programa Zero D-Scan. Los valores de densidades ópticas (DO) resultantes del registro fueron utilizados para calcular el uso relativo de cada segmento TCRVβ (Jenkins y McGinnis, 1995; Fox y Daska, 1997). Brevemente, el cálculo del uso relativo de un segmento TCRVβX, resulta de la relación entre la DO obtenida para el segmento VβX y la sumatoria de las DO de todos los transcritos TCRVβ para un determinado tejido. Teniendo en cuenta que la totalidad de Vβ analizados fueron 21, si todas las cadenas fueran expresadas al mismo nivel (y estableciendo un rango de tolerancia del 10%) el valor esperado de uso relativo de cada segmento Vβ estaría incluido en el rango 4,28-5,24%. Este cálculo resulta sumamente útil siempre que en el tejido analizado se expresen la totalidad de segmentos TCRVβ. Sin embargo, en el caso que no se expresen todos los segmentos en un mismo tejido los valores de uso relativo para los segmentos expresados resultan sobreestimados y se hace imposible

la comparación entre tejidos donde se detectan distinto número de cadenas TCRV β . Por este motivo, se introdujo un factor de corrección (nro. cadenas detectadas/21) para normalizar el uso relativo de los distintos segmentos independientemente del número de cadenas expresadas. En resumen, el uso relativo (%) de un determinado segmento TCRV β X fue calculado utilizando la fórmula:

$$\% V\beta X = \frac{DO V\beta X \times 100 \times n}{[DO (V\beta 1 + V\beta 2 + \dots + V\beta 19)] \times 21}$$

donde n es el número de segmentos amplificados para una determinada muestra.

Debido a que determinados segmentos V β son usados preferencialmente y otros están delecionados total o parcialmente en distintas cepas de ratones, de acuerdo a los valores de uso relativo obtenidos para bazo de animales controles se estableció un rango (media \pm 2DE) dentro del cual se considera que un determinado segmento posee un uso relativo normal para una determinada cepa de ratón. En consecuencia, segmentos TCRV β con valores de uso relativo por encima o debajo del rango se considerarán sobre-expresados (uso relativo aumentado) o sub-expresados (uso relativo disminuído), respectivamente, en animales infectados (Sensi y Parmiani, 1995).

B. 2- Polimorfismo de secuencias de la región CDR3 del TCR

Se analizó por clonado y secuenciación de los productos de PCR de interés.

B. 2. 1- Clonado de productos, transformación de bacterias y expansión de clones

El ligado de los productos de PCR de interés se realizó incubando 1 hr a TA 3 μ l del producto con 50 ng del vector pGEM-T Easy (Promega), en presencia de la enzima T4 ligasa, buffer de ligación y agua estéril para un volumen final de 10 μ l, según instrucciones del fabricante. Cinco μ l de los productos de ligación fueron utilizados para transformar 50

μl de bacterias competentes *E. coli* DH5 α (eficiencia $\sim 10^8$) incubándolos en hielo durante 30 min, a 42°C durante 30 seg y nuevamente en hielo 2 min. Otras bacterias de la misma cepa fueron transformadas con 1 μl de plásmido pBS(-) (10 ng/ μl) como control de eficiencia de transformación. Se agregaron 900 μl de medio LB (bacto-triptona 1% p/v, 0,5% p/v extracto bacto-levadura; NaCl 1% p/v; pH 7,0) por tubo y se incubaron en agitación 1,5 hr. La selección de los transformantes fue realizada por plaqueo de 100-200 μl de cada cultivo en placas de LB-agar conteniendo ampicilina (100 mg/ml), Xgal (40 ng/ml) e IPTG (0,5mM) incubadas 16 hs a 37°C. Según las características del vector pGEM-T Easy (Figura B), clones conteniendo insertos producen un fenotipo blanco como consecuencia de la interrupción del gen *lacZ* y clones sin inserto presentan un fenotipo azul. Al menos 20 colonias positivas (blancas) de cada transformación fueron repicadas y cultivadas 16 hs a 37°C en 3 ml de medio líquido LB en presencia de ampicilina.

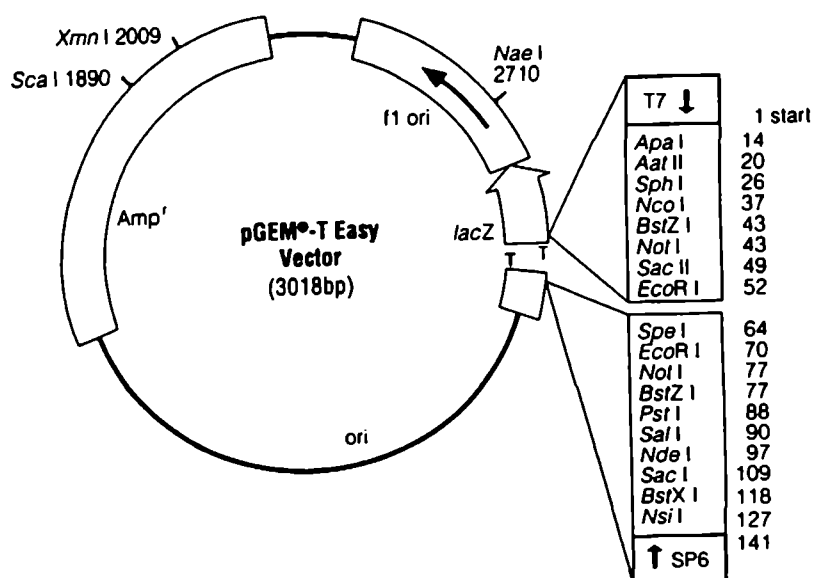


Figura B. Plásmido pGEM-T Easy utilizado para clonar los productos de PCR. Se observa la posición del gen *lacZ* y el gen de resistencia a ampicilina (*Amp^r*). A la derecha se observa un esquema del sitio de clonado. Adaptado de pGEM-T Easy, Technical Manual, Promega.

B. 2. 2- Extracción de ADN plasmídico y verificación del tamaño de insertos

La extracción de ADN se realizó por la técnica *miniprep*. Un ml y medio de los cultivos fueron pasados a tubos eppendorf y centrifugados 2 min a 6000 rpm. El sedimento se resuspendió en 200µl de solución P1 (Tris-HCl 25 mM, 10 mM EDTA, pH 7.6) en presencia de 6µl de RNAsa y se agitó vigorosamente. Se agregaron 300µl de solución P2 (NaOH 0,2N, SDS 1%), se agitó suavemente y se dejó reposar 5 min a TA para la lisis bacteriana. Se agregaron 300µl de solución P3 (Acetato de potasio 3M, pH 5), se incubó 2 min en hielo y se centrifugó 15 min a 12000 rpm en centrifuga Eppendorf modelo 5415 (Vmax). El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo al que se le agregaron 400µl de cloroformo y se centrifugó a Vmax 5 min. La fase superior acuosa se separó cuidadosamente y se transfirió a un nuevo tubo. Se agregaron 0,7-1 volumen de alcohol isopropílico, se agitó y se dejó reposar 10 min a TA. Luego de centrifugar a Vmax 20 min, el sedimento se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 20 µl de agua destilada. Cuatro µl del ADN plasmídico obtenido fueron digeridos (2 hr, 37°C) con la enzima Eco RI en un volumen final de reacción de 10µl. El tamaño de los insertos liberados fue verificado en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio. Los clones conteniendo insertos de longitud esperada (aproximadamente 420 pb y 260 pb para TCRVβ 9 y TCRVβ 13, respectivamente) fueron seleccionados para secuenciación.

B. 2. 3- Purificación por PEG y secuenciación

El ADN de los clones de interés fue purificado por PEG, a fin de lograr una buena muestra para secuenciación. Para ello se midió el volumen remanente de los clones luego de la purificación de ADN plasmídico por miniprep y digestión enzimática, y al mismo se le agregaron 0,25 volúmenes de NaCl 4M y 1,25 volúmenes de PEG 800 13% p/v. Se dejó reposar en hielo 30 min, la muestra fue luego centrifugada 30 min a Vmax y el sedimento resuspendido en 10 µl de agua estéril. El ADN obtenido fue cuantificado en geles de agarosa 1% por comparación con un marcador de masa corrido en el mismo gel. 200-400

ng del ADN de interés purificado y 10 pmol de *primer* T7 ó SP6 (en un volumen final de 5 μ l) fueron preparados para secuenciación automática, que se realizó en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB) de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM).

B. 2. 4- Análisis de los productos de secuenciación

Los cromatogramas obtenidos luego de la secuenciación fueron editados utilizando el programa Chromas versión 2.0 beta 3 (Technelysium, Australia); se seleccionaron para el análisis posterior sólo los cromatogramas que presentaron picos altos y definidos, indicativos de una buena secuenciación. Se determinó en las secuencias la región correspondiente al inserto TCRV β 9 ó 13 mediante la búsqueda de las secuencias de los primers V β y C β ó sus secuencias complementarias, dependiendo de la orientación del inserto. Se descartaron las zonas de las secuencias a la izquierda de la región V β y a la derecha de la región C β y la zona de interés correspondiente al inserto fue traducida en los 3 marcos de lectura. El marco de lectura correcto fue determinado y su secuencia aminoacídica exportada al programa Edit Seq del paquete Dna Star, seleccionándose el segmento correspondiente al CDR3, más unos pocos aminoácidos hacia los extremos carboxi- y amino terminales. Posteriormente las secuencias correspondientes a la región CDR3 fueron alineadas (Meg Align) utilizando el método Clustal y se determinaron las distancias entre secuencias (porcentaje de homología) de distintos clones de un mismo tejido (por ej, médula RA ó nervio RA ó bazo normal ó bazo RA, etc) o entre clones de distintos tejidos o distintas condiciones de un mismo tejido (por ej, médula y nervio RA; bazo normal e infectados; nervio RA y bazo RA, etc).

B. 3- Detección de parásitos en tejidos

B. 3. 1- Preparación de ADN

Se realizó a partir de los siguientes tejidos de animales crónicamente infectados: músculo esquelético, nervio ciático, médula espinal y bazo. Para todos los tejidos excepto nervio (por lo escaso del material) se utilizaron los tejidos de los mismos animales en los cuales se había estudiado el repertorio TCRV β . Los tejidos fueron primero homogeneizados en mortero estéril pre-enfriado con N₂. El material resultante se pasó a un tubo eppendorf donde se agregó 0,5 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 10 mM, NaCl 0,1M, SDS 0,5%, proteinasa K 300 μ g/ml); la muestra se incubó toda la noche a 37°C y 3 horas a 55°C. Las muestras se centrifugaron para separar los restos celulares, el sobrenadante fue extraído 2 veces con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo. La fase acuosa obtenida fue precipitada por el agregado de 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (pH 5,5) y dos volúmenes de etanol 100% frío. Luego de centrifugar, el sedimento fue lavado con etanol 70%, secado y resuspendido en agua. La presencia e integridad del ADN se verificó en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio.

B. 3. 2- Amplificación por PCR

Se utilizaron *primers* para un segmento repetitivo de ADN nuclear de *T. cruzi* de 195 pb (TCZ1: 5'cgagctcttgcccacacgggtgct3'; TCZ2: 5'cctccaagcagcggatagttc3') (Moser y col, 1989). La amplificación por PCR se realizó en mezclas de reacción de 20 μ l conteniendo buffer adecuado, 0,4U de enzima Taq polimerasa, 0,2mM dNTPs, 1,5mM MgCl₂, 1 μ M de cada uno de los *primers* y 1-5 μ l de templado de ADN. Las condiciones de amplificación incluyeron un primer ciclo de 94°C, 4 min, seguido por 25 ciclos de 94°C para desnaturalizar el templado (30 seg), 60°C para alineación de *primers* (90 seg) y 72°C para extensión (2 min). Al final del último ciclo las muestras se incubaron por un período adicional de 10 min a 72°C y luego se enfriaron a 4°C.

Diez μ l de cada muestra de reacción fueron corridos (5V/cm) en geles de agarosa 2% preparada con bromuro de etidio. Los geles fueron visualizados por transiluminación UV en un aparato EPI-Chemi Dark Room (UVP) conectado a computadora donde las imágenes fueron almacenadas.

B. 4- Expresión de citoquinas en tejidos

Se estudió la expresión tisular de citoquinas IFN γ , TNF α , IL-1 β e IL-6 por la técnica de RT-PCR en 3 animales infectados con CA-I, 5 infectados con RA y 3 controles. Se realizaron preparaciones de cADN a partir de ARN total obtenido de tejidos según se detalló en los puntos A.1.2- y A.1.3 de esta sección. Posteriormente se amplificaron por PCR secuencias específicas para las diferentes citoquinas utilizando 1 μ l de cADN y los siguientes *primers*:

TNF α : 5'tct cat cag ttc tat ggc cc 3'

5'ggg agt aga caa ggt aca ac 3'

IFN γ : 5'gtc aca gtt ttc agc tgt ata gg 3'

5'agc ggc tga ctg aac tca gat tg 3'

IL-6: 5'ggt ctc tgg gaa atc gtg ga 3'

5' tgt act cca ggt agc tat gg 3'

IL-1 β : 5' ttg acg gac ccc aaa aga tg 3'

5' aga agg tgc tca tgt cct ca 3'

Las concentraciones de buffer, enzima, dNTPs y MgCl₂ fueron las mismas que las detalladas en el punto A.1. 4. El perfil de amplificación fue el siguiente:

IL-1 β , TNF α e IL-6

94°C: 2,30 min

94°C: 45 secs

55°C: 1 min

72°C: 1 min

72°C: 3 min

4°C

} 30 ciclos

IFN γ

95°C: 2 min

94°C: 50 secs

60°C: 50 secs

72°C: 1 min

72°C: 4 min

4°C

} 30 ciclos

ANEXO: Soluciones utilizadas para la detección de productos de PCR por dot-blot e hibridización.

Buffer de dilución de ADN: 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA pH 8,0; 50 µg/ml esperma de salmón.

Buffer ácido maleico: ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15 M pH 7,5 (ajustado con NaOH sólido).

Solución de bloqueo 10X: reactivo de bloqueo 10% en buffer ácido maleico.

Solución de hibridización: 5X SSC, 1% solución de bloqueo, 0,1% p/v N-lauroylsarkosine, 0,02% p/v SDS en buffer ácido maleico

20X SSC: NaCl 3M, citrato de sodio 0,3 M; pH 7,0 (20°C)

Soluciones de lavado de hibridización:

- a) 2X SSC, 0,1% SDS
- b) 0,1% SSC, 0,1% SDS

Solución lavado de detección: buffer ácido maleico-0,6% Tween 20

Buffer de bloqueo de detección: solución de bloqueo 1X, diluída en buffer ácido maleico.

Buffer detección: Tris-HCl 0,1 M; 0,1 M NaCl; pH 9,5.

Resultados

A- Participación de factores humorales en patogenia

A. 1- Reactividad de sueros frente a antígenos de *Trypanosoma cruzi*

La reactividad frente a Ag de *T. cruzi* en sueros de animales infectados con las cepas RA (n=41) o CA-I (n=51), obtenidos a distintos tiempos post-infección (tpi), se evaluó por la técnica de ELISA. En todos los casos, la infección de los animales había sido confirmada por detección de trip por MHT a los 10-15 dpi. La reactividad frente a Ag parasitarios resultó positiva desde tiempos tempranos post-infección para sueros de ambas cepas (15 dpi, $p < 0,05$ vs. suero normal, *t* test) aunque el título de los mismos a este tiempo fue muy bajo (1/50). Por otro lado, en la Figura 1 se observa que ya a los 15 dpi los valores de densidades ópticas (DO) obtenidos son mayores para los sueros CA-I que para los sueros RA ($p < 0,05$). Esta diferencia cuantitativa en la absorbancia se mantiene en todos los tpi ensayados e incluso se hace más marcada en los sueros de animales crónicamente infectados (90 dpi: $p < 0,01$ [RA: n=8; CA-I: n= 5]; 120 dpi: $p < 0,001$ [RA: n= 20; CA-I: n= 12]; *t* test) (Figura 1). Sin embargo, todos los sueros obtenidos a tiempos ≥ 90 dpi presentaron títulos ≥ 800 , independientemente de la cepa parasitaria infectante.

Para la realización de estos ensayos se incluyó un lote de animales infectados con la cepa CA-I por vía idp, vía habitualmente empleada para inocular los ratones con RA. Los valores de DO obtenidos para los animales CA-I-idp fueron similares a los detectados en los inoculados por vía ip; por ejemplo, a los 120 dpi los valores de DO en la dilución 1/50 fueron $1,27 \pm 0,045$ y $1,057 \pm 0,093$ ($p > 0,05$; *t* test) para los ratones idp e ip, respectivamente. Más aún, las DO de sueros de ratones infectados con la cepa CA-I-idp, también fueron significativamente superiores a las de los ratones inoculados con RA por la misma vía en todos los tiempos analizados (15 dpi: $0,134 \pm 0,024$ vs. $0,029 \pm 0,004$, $p < 0,05$; 90 dpi: $0,939 \pm 0,089$ vs. $0,4313 \pm 0,064$, $p < 0,05$; 120 dpi: $1,27 \pm 0,045$ vs. $0,482 \pm 0,049$, $p < 0,01$; *t* test). En resumen, las diferencias en las DO entre ambas cepas no pueden ser atribuidas a la utilización de distintas vías de inoculación.

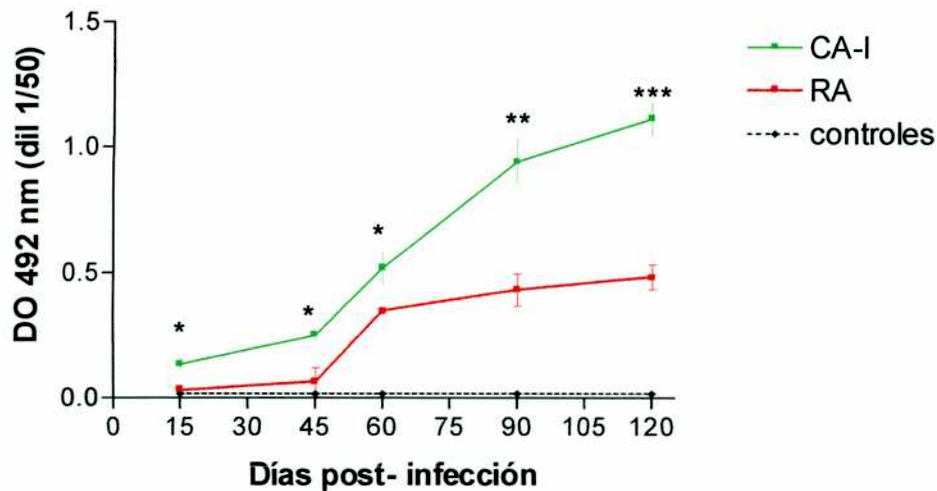


Figura 1. Serología anti- *T. cruzi*. Reactividad frente a antígenos parasitarios de sueros de animales infectados con las cepas RA o CA-I obtenidos a distintos tiempos post-infección. Se muestran los valores de densidad óptica registrados en la dilución 1/50, ELISA. *: $p < 0.05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; RA vs. CA-I; *t* test.

A. 2- Reactividad *in vitro* hacia antígenos conformacionales murinos

Se investigó la reactividad de sueros de animales infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi* hacia Ag conformacionales de nervio y músculo esquelético sobre cortes de tejido normal utilizando la técnica de IFI.

La reactividad *in vitro* de sueros de animales infectados mostró patrones de fluorescencia con depósitos de IgG en la matriz intersticial marcando –probablemente- el curso axonal y/o vainas de mielina en los cortes de nervio (Figura 2A). El patrón de marcación fue similar para sueros obtenidos de animales infectados con una u otra cepa de *T. cruzi* y fue detectado en el 76,00% (19/25) y 70,83% (17/24) de los antisueros RA y CA-I respectivamente ($p > 0,4$). A pesar del bajo título contra Ag parasitarios de los sueros

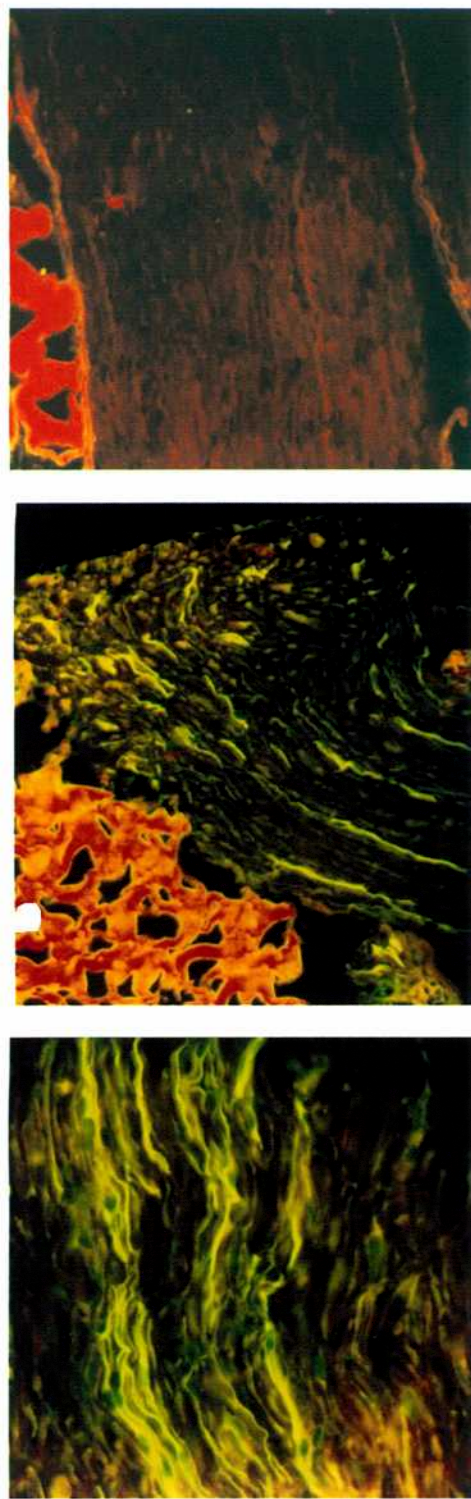
obtenidos a 15 dpi, la mayoría de estos sueros fueron reactivos contra Ag conformacionales de nervio ciático cuando se ensayó la misma dilución (1/50) (Tabla 1). Los sueros obtenidos en el período crónico de infección también presentaron una alta reactividad contra Ag de nervio ciático (Tabla 1). Los sueros con reactividad hacia Ag de nervio fueron definidos como Ne+ y los no reactivos como Ne-; sueros de animales controles no mostraron reactividad inespecífica (Figura 2A).

La reactividad hacia músculo esquelético mostró depósitos de IgG en endomisio y sarcolema, con patrones similares para sueros de ambas cepas (Figura 2B). Se detectó reactividad anti-músculo en el 53% de sueros CA-I (n=15) y en el 36% de sueros RA (n=11), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. La reactividad en función del tiempo pi al que fueron obtenidos los sueros se detalla en la Tabla 1.

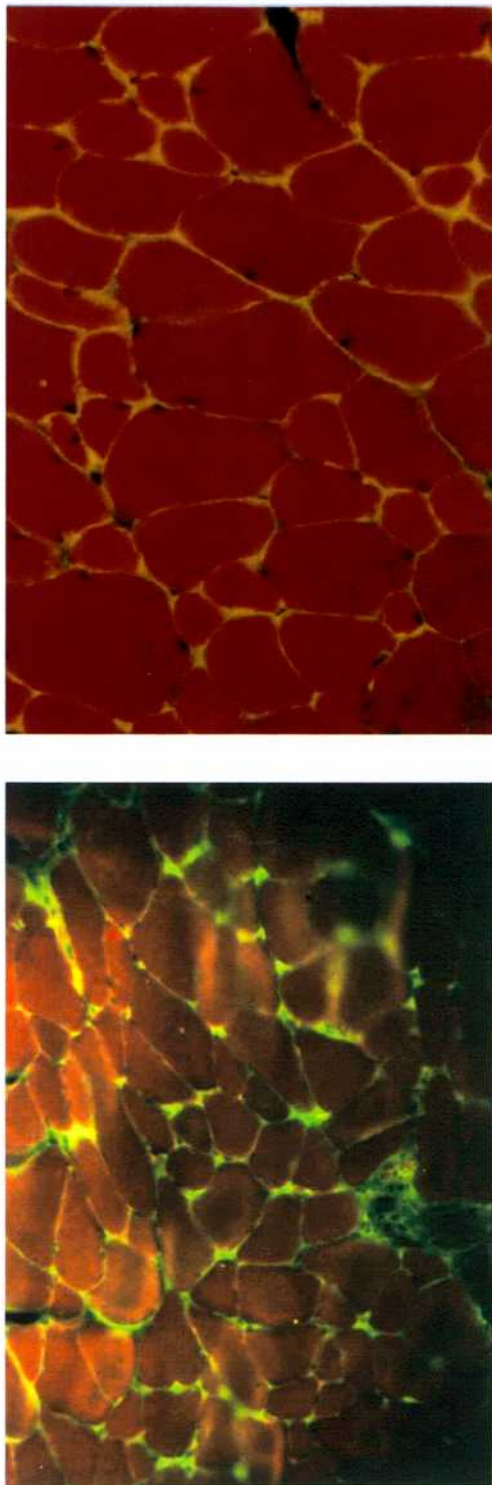
Tabla 1. Reactividad de sueros de animales infectados con *T. cruzi* obtenidos a distintos tiempos post-infección (pi) contra tejidos murinos normales, IFI.

Tejido murino	Suero de animales infectados		
	Días p.i.	RA (n)	CA-I (n)
NERVIO	15	80,00 ¹ (5)	80,00 (5)
	120	88,89 (9)	71,43 (14)
	270	63,64 (11)	60,00 (5)
	Total	76,00 (25)	70,83 (24)
MUSCULO	15	50,00 (2)	40,00 (5)
	120	20,00 (5)	50,00 (6)
	270	50,00 (4)	75,00 (4)
	Total	36,36 (11)	53,33 (15)

¹: Los valores son expresados como el porcentaje de sueros con reactividad positiva contra el tejido en relación al total de sueros ensayados en cada tiempo pi.



A



B

Figura 2. Patrones de reactividad de sueros de ratones C3H/HeN frente a tejido murino normal. IFI.
A: Nervio, corte longitudinal (izquierda [detalle] y centro [panorámica]); suero de animales infectados; derecha: control).
B: Músculo, corte transversal (izquierda: suero de animal infectado; derecha: control [panorámicas]).

A. 3- Estudios electrofisiológicos en ratones receptores de sueros

Teniendo en cuenta la alta reactividad hacia Ag de nervio en sueros de ratones infectados, se decidió evaluar el efecto de la inyección epineural de sueros sobre el potencial de acción del nervio ciático (PAN), el cual está comprometido en animales crónicamente infectados (Losavio y col, 1993). Cuatro días post-inyección (dpy) se evaluó electrofisiológicamente la latencia, amplitud, número de fases y duración del PAN. En ratones receptores de sueros de animales no infectados (sueros controles) los valores de los diferentes parámetros del PAN obtenidos en los nervios inyectados y contralaterales fueron similares, mostrando que el posible efecto traumático de la inyección de suero no afectaba la funcionalidad del nervio ciático (Tabla 2). Animales receptores de sueros obtenidos de ratones infectados con la cepa RA (sueros RA) presentaron incrementos del tiempo de latencia de $52,8 \pm 9,7\%$ y disminución de la amplitud de $32,7 \pm 5,2\%$ en los nervios inyectados respecto de los contralaterales no pinchados. El rango de los valores absolutos de latencia y amplitud observado en los nervios contralaterales de receptores de sueros RA fue similar a los valores registrados en los animales controles (latencia: 0,7-1,1 ms; amplitud: 2,17-6,5 mV). El número de fases y la duración del PAN no fueron afectados por la transferencia de suero RA. Sin embargo, no todos los sueros RA inducían en los receptores las alteraciones de latencia y amplitud mencionadas. De hecho, al evaluar los efectos de los sueros sobre la conductividad nerviosa teniendo en cuenta su reactividad hacia Ag de nervio (sueros RA/Ne+ ó RA/Ne-), se observó que de todos los sueros RA sólo aquellos RA/Ne+ eran los que inducían las anomalías del PAN (Tabla 2). Los animales receptores de sueros RA/Ne+ presentaron aumentos de $71,8 \pm 12,8\%$ en el tiempo de latencia y disminución de la amplitud de $45,6 \pm 5,2\%$ mientras que los receptores de sueros RA/Ne- mostraron parámetros electrofisiológicos similares al grupo control (Tabla 2). En la Figura 3 se muestran los registros del PAN en un animal receptor de suero RA/Ne+ obtenido de un dador con infección crónica.

Por otro lado, no se registraron alteraciones en ningún parámetro del PAN en receptores de sueros CA-I, independientemente de que fueran Ne+ ó Ne- (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros del potencial de acción del nervio ciático (PAN) registrados en ratones receptores de sueros controles o de animales infectados. Relación con cepa parasitaria infectante y reactividad *in vitro* hacia antígenos de nervio.

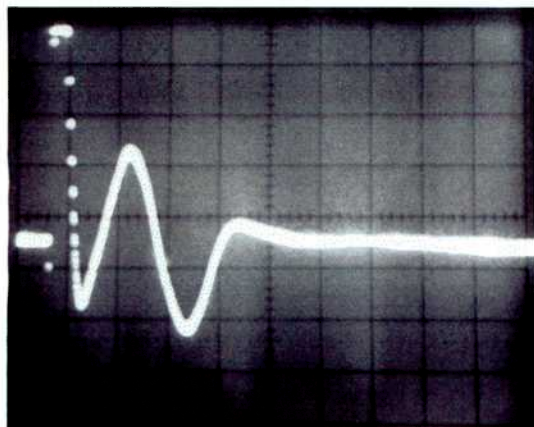
Transferencia epineural de	Reactividad del suero (n)	Potencial de acción del nervio ciático (%) ^a			
		Latencia	Amplitud	Duración	Nro. Fases
Suero control	(6)	96,22±3,01	96,45±4,22	103,50±2,87	102,00±4,12
	Total (9)	152,80±9,70**	67,34±5,17*	87,61±2,52	95,18±4,94
Suero RA	Ne ^b (6)	171,80±12,81***	54,37±5,15**	89,12±3,16	96,95±7,20
	Ne ^c (3)	114,90±5,48	93,27±7,69	84,60±4,18	91,66±3,82
	Total (8)	109,70±4,51	108,70±8,99	88,28±4,56	96,93±5,27
Suero CA-I	Ne ^b (6)	111,00±5,81	98,8±8,89	91,65±6,02	100,6±5,92
	Ne ^c (2)	107,40±7,42	126,50±18,87	81,53±6,33	90,26±10,31

^a: El PAN fue registrado en los animales receptores 4 días luego de la inyección epineural de suero (dpy). Los valores son expresados como la media ± error estándar y representan el porcentaje de la respuesta del nervio inyectado (derecho) respecto de la respuesta obtenida en el nervio contralateral (izquierdo) no inyectado, tomada como 100%, para cada parámetro medido en cada animal.

^b: Sueros con reactividad positiva contra antígenos de nervio ciático, determinada por IFI *in vitro*.

^c: Sueros no reactivos con antígenos de nervio *in vitro* (IFI).

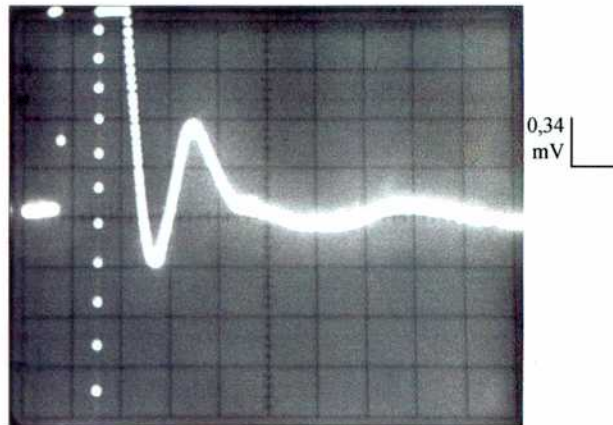
*: p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001, vs. valores obtenidos en animales inyectados con suero normal. ANOVA.



Nervio contralateral

Amplitud: 2,38 mV (cal: 1 div=0,66 mV)

Latencia: 0,8 ms



Nervio inyectado

Amplitud: 0,95 mV (cal: 1 div=0,34 mV)

Latencia: 2 ms

Figura 3. Detalle del registro del potencial de acción nervioso (PAN) en un animal receptor de suero RA/Ne+ de un dador con infección crónica. Los animales receptores fueron inoculados en el nervio ciático derecho (inyectado) con 30 μ l de suero. Luego de 4 días los animales fueron anestesiados, el nervio ciático expuesto y montado en un hemitubo de teflón conteniendo 2 electrodos de estimulación, 2 de registro y una tierra. Se administraron pulsos rectangulares de voltaje y los parámetros del PAN obtenidos fueron almacenados en un osciloscopio (fotos).

A. 4- Estudios electrofisiológicos en ratones receptores de parásitos

Otro grupo experimental fue inyectado por la misma vía (epineural) con 60 trip. Los animales fueron seguidos parasitológicamente para verificar el momento de aparición de trip en sangre y los ensayos electrofisiológicos realizados a distintos tiempos py. A los 4 dpy, no se detectaron anomalías en los parámetros del PAN (no mostrado) ni parásitos circulantes en ninguno de los 8 receptores de trip (RA: n=4; CA-I: n=4). A partir de los 10 y 15 dpy fue posible detectar trip por MHT en los animales inyectados por vía epineural con RA y CA-I, respectivamente. La positivización de la gota fresca fue a partir de los 17 dpy para receptores de ambas cepas de parásitos. Coincidentemente con la aparición de parásitos circulantes, se registró aumento del tiempo de latencia en los receptores de trip RA a los 10 dpy, aunque los demás parámetros del PAN no fueron modificados (Tabla 3). A los 17 dpy receptores de trip RA y CA-I mostraron reducción en la amplitud y aumento del tiempo de latencia en el nervio inyectado respecto del contralateral (Tabla 3). Los valores absolutos de amplitud ($<2,31\text{mV}$) y latencia ($\geq 1,3\text{ ms}$) hallados en los nervios contralaterales no inyectados en los receptores de trip estaban alterados respecto de los obtenidos en los controles. Sin embargo, las anomalías en los valores absolutos detectadas en los nervios inyectados fueron aún mayores lo cual permitió registrar diferencias entre los nervios pinchados y contralaterales. La duración y número de fases del complejo no evidenciaron diferencias respecto de los controles en ningún caso (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la inyección epineural de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* sobre el potencial de acción del nervio ciático (PAN)

Inóculo	Potencial de acción del nervio ciático (%) ^a			Nro. Fases
	Latencia	Amplitud	Duración	
PBS (n=5)	105,00±19,28	96,08±14,82	96,62±6,43	113,3±16,17
Trip RA 10 dpy (n=4)	157,20±8,23**	99,95±5,28	90,00±5,77	88,08±7,91
Trip RA 17 dpy (n=6)	207,70±14,76***	20,81±3,01***	105,50±7,07	100,00±7,30
Trip CA-1 17 dpy (n=8)	157,00±9,76***	25,13±2,72***	107,12±6,88	98,55±15,50

^a: El PAN fue registrado en los animales receptores a los 4 (no mostrado), 10 y 17 días luego de la inyección epineural (dpy) de PBS o tripomastigotes circulantes (trip) de las cepas RA o CA-I de *T. cruzi*. Los valores son expresados como la media ± error estándar y representan el porcentaje de la respuesta del nervio inyectado (derecho) respecto de la respuesta obtenida en el nervio contralateral (izquierdo) no inyectado, tomada como 100%, para cada parámetro medido.

** : p < 0,01; *** : p < 0,001, vs. valores obtenidos en animales inyectados con PBS, ANOVA.

A. 5- Búsqueda de ADN de *T. cruzi* en receptores de sueros y parásitos

Teniendo en cuenta que la amplitud y latencia del PAN se encontraban alterados tanto en receptores de sueros como de trip, el siguiente paso fue investigar si las alteraciones encontradas en los animales receptores guardaban algún correlato con la presencia de parásitos en los nervios. Como puede observarse en la Figura 4, no fue detectado ADN de *T. cruzi* por PCR en los nervios de animales transferidos con sueros (calles 10-11), indicando que las anormalidades del PAN luego de la inyección de suero RA/Ne+ no se debían a la presencia de parásitos *in situ* 4 dpy. La búsqueda de material genético de *T. cruzi* también resultó negativa cuando los nervios de receptores de sueros se procesaron a los 10 y 17 dpy (no mostrado). Por otro lado, aunque no se localizaron nidos de amastigotes microscópicamente en receptores de trip (ver más adelante), sí fue posible revelar ADN de *T. cruzi* a partir de los 10 dpy. La carga parasitaria fue mayor en los nervios inyectados que en los contralaterales a los 10 y 17 dpy (Figura 4, calles 3-6). No se detectó material parasitario en nervio a los 4 dpy en receptores de trip (calles 1-2).

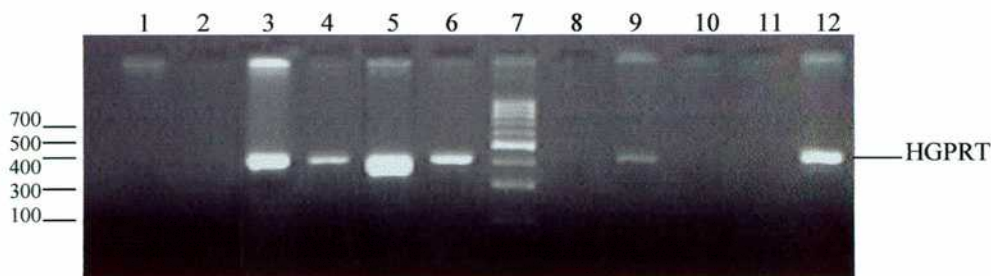


Figura 4. Búsqueda de ADN de *T. cruzi* por PCR en nervios de animales transferidos. Nervios de animales inyectados con trip RA a 4 dpy (1: inyectado, 2: contralateral), 10 dpy (3: inyectado, 4: contralateral) y 17 dpy (5: inyectado, 6: contralateral). Nervios de animales receptores de sueros obtenidos en el período agudo (calle 10) o crónico de infección (calle 11) RA/Ne+. Controles: nervio de animal no transferido (calle 8), suero RA (calle 9) y nervio de animal crónicamente infectado con la cepa RA (calle 12). Calle 7: marcador de peso molecular 100 pb ladder.

A. 6- Ensayos electrofisiológicos en receptores de IgG y AgPL

Los ensayos anteriores mostraban que las alteraciones del PAN coincidían con la presencia de parásitos en nervios en receptores de trip pero no en los receptores de sueros. ¿Serían entonces inmunoglobulinas presentes en el suero o AgPL al mismo los que mediaban las alteraciones electrofisiológicas? Se evaluó el efecto de la transferencia epineural de IgG purificada de pools de sueros RA/Ne⁺ y AgPL sobre el PAN (Tabla 4). Ratones transferidos con IgG/Ne⁺ purificada mostraron una disminución de la amplitud del $39,1 \pm 0,8\%$, aunque la latencia no fue modificada significativamente (Tabla 4). La inyección epineural de suero RA/Ne⁺ depletado de IgG o la de AgPL no indujo alteraciones del PAN en los receptores. Tampoco cancelaron el efecto producido por la transferencia de IgG RA/Ne⁺ cuando se transfirieron simultáneamente al mismo animal (% de disminución de amplitud: [(IgG RA/Ne⁺) + suero depletado]: $24,7 \pm 4,8\%$; [(IgG RA/Ne⁺) + AgPL]: $31,9 \pm 11,9\%$) (Tabla 4).

A. 7- Estudios histopatológicos y búsqueda de IgG por IFI *ex vivo* en animales receptores

Las alteraciones electrofisiológicas ¿son consecuencia de IgG RA/Ne⁺ reactiva hacia estructuras del nervio 4 dpy y/o la presencia de IgG *in situ* atrae otras células del sistema inmune que median estas alteraciones? Las anomalías de PAN ¿se correlacionan con daño histopatológico? Para contestar estos nuevos interrogantes se realizaron estudios histopatológicos y búsqueda de IgG por IFI *ex vivo* en animales receptores de suero Ne⁺ y trip.

Infiltrados leves, principalmente compuestos por PMN y células mononucleares fueron detectados exclusivamente en los nervios inyectados con sueros RA/Ne⁺ de infección crónica (Figura 5A). Si bien la presencia de infiltrados es coherente con las anomalías electrofisiológicas encontradas en los receptores del mismo tipo de sueros, la intensidad de los mismos no se condice con las marcadas alteraciones observadas en el PAN. Nervios

inyectados con sueros RA/Ne+ de infección aguda ó sueros crónicos CA-I/Ne+ no mostraron inflamación (Figura 5B). En ningún caso se detectaron focos inflamatorios en los nervios contralaterales.

En los nervios inyectados con sueros RA/Ne+, extraídos y procesados 4 dpy fueron detectados depósitos de IgG *ex vivo*. El patrón de reactividad mostró marca en el curso axonal y vainas de mielina (Figura 6 A, B). Los sueros que presentaron mayores depósitos de IgG en los nervios receptores fueron aquellos que inducían alteraciones de latencia y amplitud más marcadas. En secciones de nervios de animales receptores de suero RA/Ne+ de infección aguda se observaron depósitos aislados de IgM. No fueron detectados depósitos de IgG ni IgM *ex vivo* en receptores de sueros CA-I/Ne+, aún cuando estos sueros habían presentado reactividad contra nervio normal por IFI *in vitro* como se describió en el punto A.2 de esta sección. Depósitos del componente C3 del complemento no fueron revelados en ningún caso.

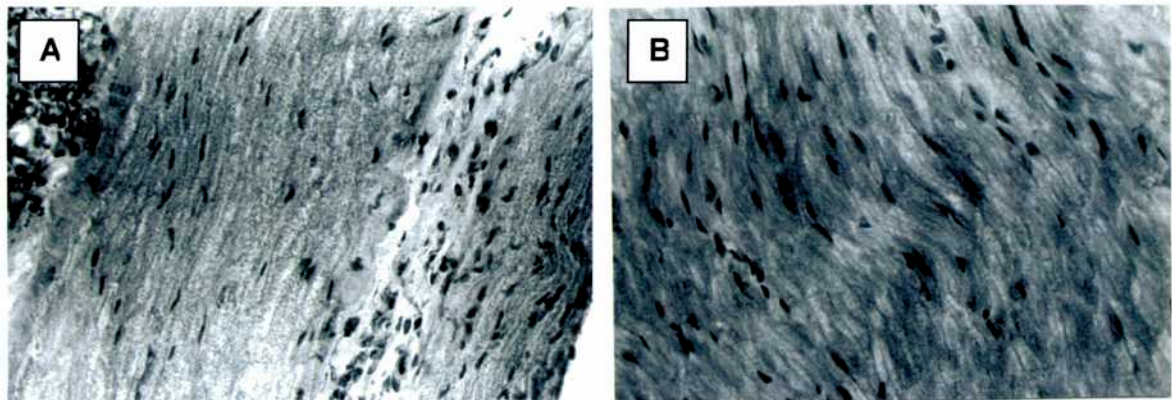


Figura 5. Histopatología de nervios de animales transferidos con (A) suero RA/Ne+ (nervio inyectado, 4 dpy) o (B) suero CA-I/Ne+ (nervio inyectado, 4 dpy). H&E.

Tabla 4. Latencia y amplitud del PAN en animales receptores inyectados por vía epineural con IgG purificada, suero depletado de IgG y AgPL.

Nervios transferidos con	(n)	Potencial de acción del nervio ciático ^a	
		Latencia (%)	Amplitud (%)
IgG control	(4)	102,50±2,50	103,90±5,09
IgG RA/Ne ⁺	(4)	120,80±12,47	60,89±0,76***
Suero RA/Ne ⁺ depletado de IgG	(3)	100,00±0,00	105,90±2,16
IgG RA/Ne ⁺ + suero depletado de IgG	(4)	112,50±12,50	75,27±4,84*
AgPL	(3)	100,00±0,00	97,43±2,57
IgG RA/Ne ⁺ + AgPL	(3)	100,00±0,00	68,13±11,87**

^a: El PAN fue registrado en los animales receptores 4 dpy luego de la inyección epineural de IgG, AgPL, suero depletado de IgG, o combinaciones de los mismos. Los valores de latencia y amplitud son expresados como la media ± error estándar y representan el porcentaje de la respuesta del nervio inyectado (derecho) respecto de la respuesta obtenida en el nervio contralateral (izquierdo) no inyectado, tomada como 100%, para cada parámetro medido en cada animal.

*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001, vs. valores obtenidos en animales inyectados con suero normal. ANOVA.

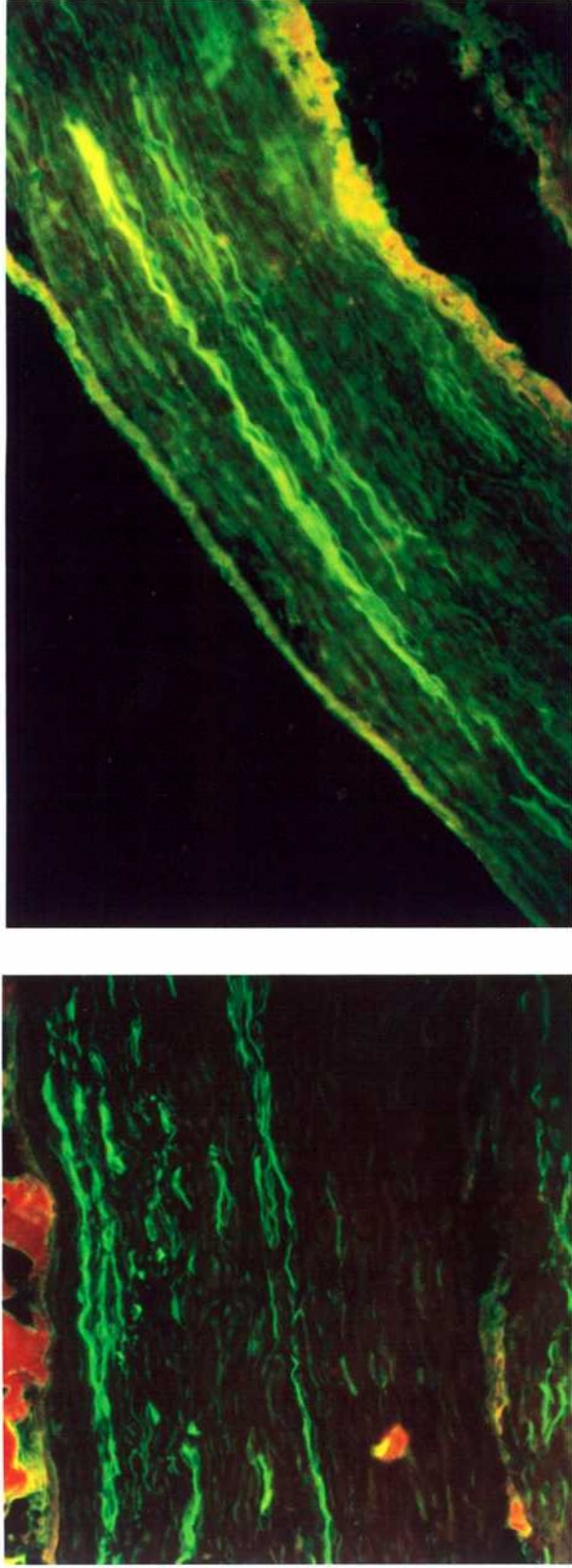


Figura 6. Patrones de inmunofluorescencia *ex vivo* en dos receptores de suero RA/Ne+ 4 dpy.
Izquierda: 400 X; derecha: panorámica 100 X.

En los receptores de trip, las alteraciones en la histopatología del nervio fueron más marcadas coincidentemente con el aumento de la parasitemia. Así, a los 4 dpy no se observaron infiltrados, a los 10 dpy los nervios inyectados presentaron infiltrados leves compuestos por células mononucleares y polimorfonucleares (Figura 7A) y los nervios contralaterales vasculitis (Figura 7B). A los 17 dpy, se detectaron infiltrados inflamatorios moderados en el epi, peri y endoneuro en el nervio inyectado (Figura 7C) e infiltrados leves en los nervios contralaterales, con similar composición. No se visualizaron nidos de amastigotes en los cortes histológicos.

El estudio de la estructura de la mielina luego de su tinción con luxol fast-blue y tetróxido de osmio no evidenció alteraciones detectables microscópicamente. Las secciones de nervios analizadas no presentaron cámaras de digestión ni ovoides de mielina, independientemente de que los nervios fueran de animales receptores de sueros o trip.

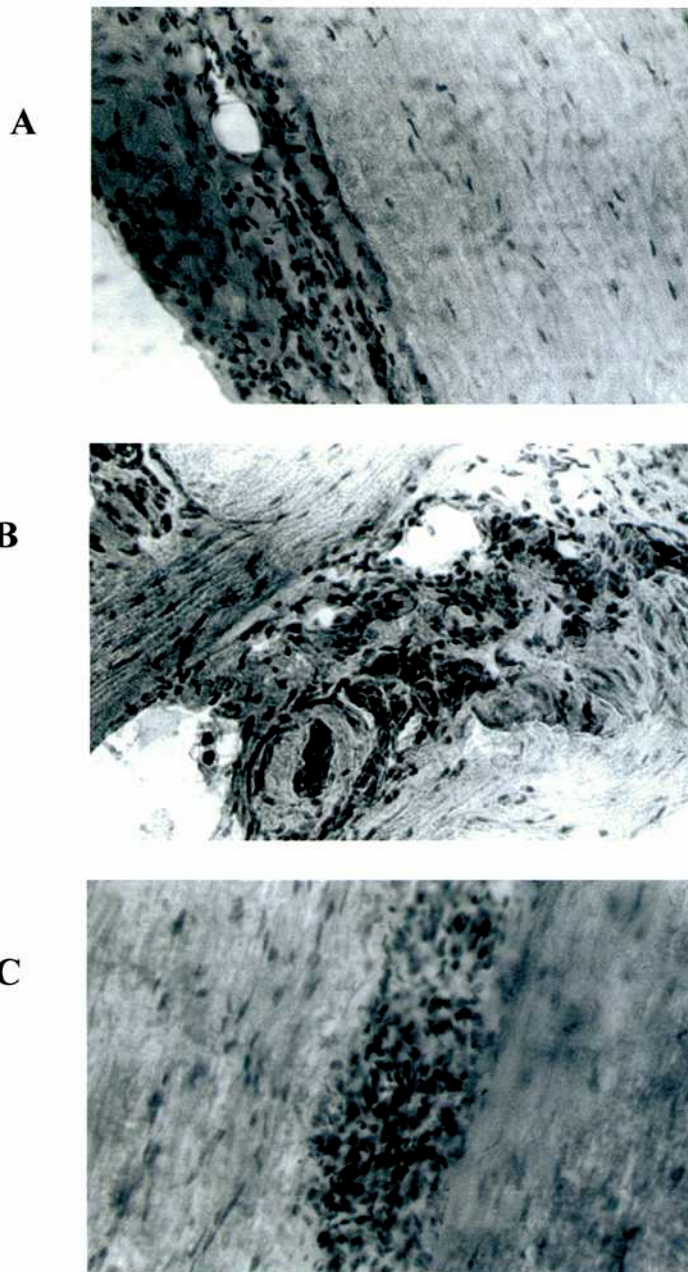


Figura 7. Histopatología de nervios de animales receptores de trip. H&E, 400 X. A: nervio inyectado, 10 dpy. B: nervio contralateral, 10 dpy. C: nervio inyectado, 17 dpy.

B- Participación de LT en la producción de daño

B. 1- Caracterización de las cadenas V β del receptor de células T (TCR).

Ratones C3H/HeN infectados con la cepa RA de *T. cruzi* presentan principalmente daño neuropático mientras que los animales infectados con la cepa CA-I evidencian signos de daño muscular primario durante la fase crónica de la infección (Sanz y col, 1991). Los órganos principalmente injuriados son el nervio y la médula en los infectados con RA y el músculo esquelético en los infectados con CA-I (Mirkin y col, 1994). Además, la transferencia pasiva de LT de dadores infectados con la cepa CA-I induce en los receptores daño muscular y la transferencia de LT de animales infectados con RA compromiso en médula y nervio en los receptores (Mirkin y col, 1997). En consecuencia, se han definido como principales órganos blanco de daño al músculo en animales infectados con la cepa CA-I y al nervio y médula en los infectados con la cepa RA.

B. 1. 1- Puesta a punto de la técnica de RT-PCR para la detección de cadenas V β del TCR

Como las técnicas de biología molecular utilizadas en esta parte de la Tesis fueron montadas en el laboratorio y puestas a punto durante el presente trabajo, se detallan algunos datos que sin ser resultados específicos pueden ser de valor para el análisis del manejo tecnológico.

La extracción de ARN produjo rendimiento y pureza adecuados cuando los tejidos se procesaron y el material obtenido se resuspendió en los volúmenes indicados en la sección Materiales y Métodos. La concentración de ARN obtenida de los distintos tejidos se detalla a continuación:

	Nervio: 360,6 \pm 44,34 μ g/ml
Bazo: 688,2 \pm 73,01 μ g/ml	Médula: 463,6 \pm 20,14 μ g/ml
Linfocitos: 360,6 \pm 41,84 μ g/ml	Músculo: 651,0 \pm 77,95 μ g/ml

En todos los casos, la relación DO 260/280 nm dio una proporción $\geq 1,78$, lo cual indica un buen grado de conservación del mismo y contaminación despreciable por ADN o proteínas. Con el fin de controlar si el ARN obtenido era adecuado para su utilización en RT-PCR, luego de la transcripción reversa del ARN, se realizaron ampliificaciones del cADN con *primers* específicos para actina murina (Figura 8).

Posteriormente, se puso a punto la técnica de RT-PCR para la amplificación de los 21 segmentos TCRV β , optimizando la concentración de MgCl₂ para cada par de *primers* (C β y V β correspondiente) utilizando linfocitos de sangre periférica de ratones normales. Las cadenas V β 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 9, 13, 14, 15, 17 y 19 amplificaron con una concentración de MgCl₂ 2,5 mM final y los segmentos V β 4, 10, 11, 12, 16 y 18 con MgCl₂ 3,75 mM. En la Figura 9 se observa el patrón de bandas obtenidas luego de la amplificación y corrida en geles de acrilamida teñidos con bromuro de etidio. En todos los casos los amplicones mostraron un tamaño de 360-420 pares de bases (pb), salvo para las cadenas V β 10 (290 pb), V β 12 (190 pb) y V β 13 (260pb), coincidiendo con lo esperado, aunque no fue posible detectar las cadenas V β 3, 5 ni 11 por esta técnica (Figura 9).

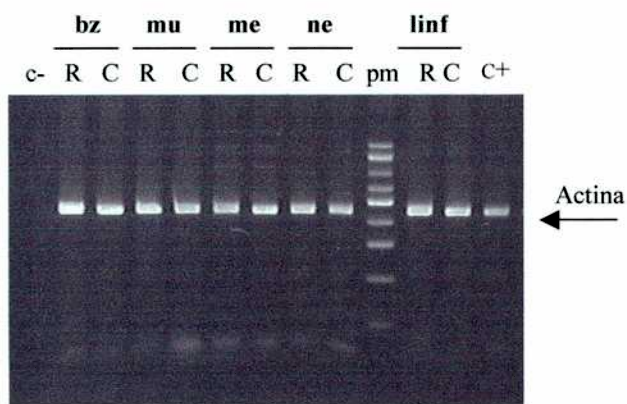


Figura 8. Amplificación por RT-PCR de actina murina a partir de RNA (2,5 μ g) extraído de tejidos de animales crónicamente infectados con la cepas RA (R) o CA-I (C) de *T. cruzi*. Bz: bazo; mu: músculo esquelético; me: médula espinal; ne: nervio ciático; linf: linfocitos de sangre periférica. Gel de poliacrilamida 6% con BrEt. c+: control positivo; c-: control negativo.

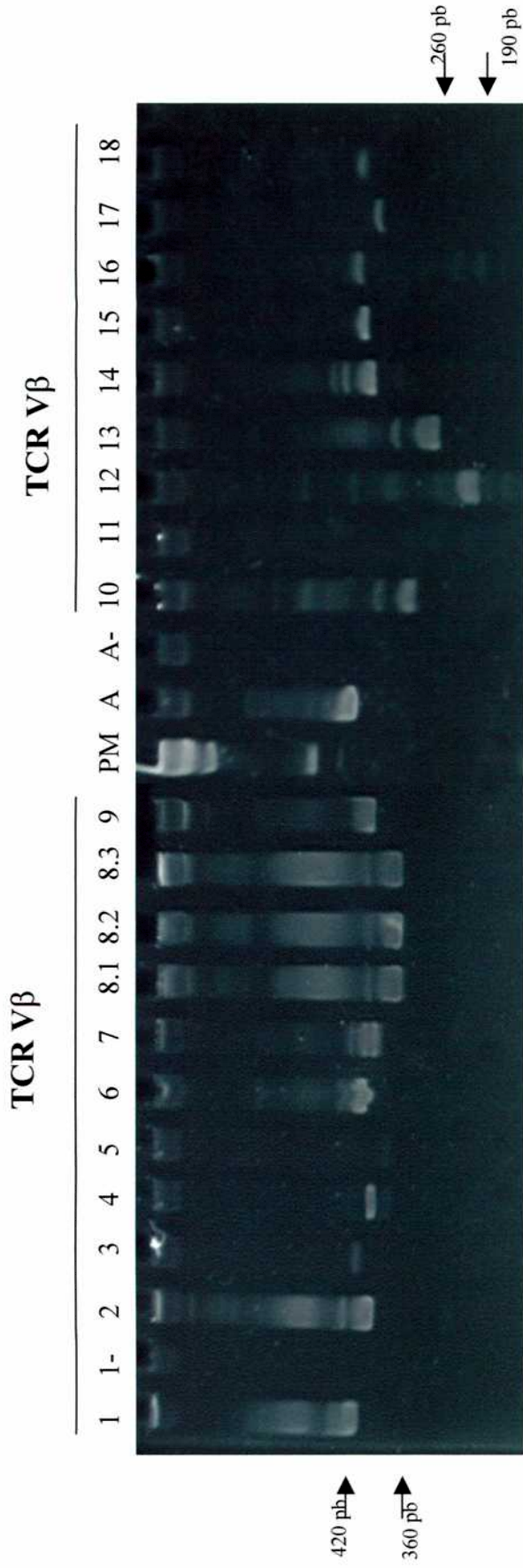


Figura 9. Productos de amplificación por RT-PCR de cadenas V β del TCR en linfocitos de sangre periférica de animales controles. Los productos fueron corridos en geles de acrilamida 6% y revelados por tinción con bromuro de etidio. Todos los segmentos TCR V β dan productos de amplificación de 360-420 pb, excepto V β 10 (290 pb) y V β 13 (260 pb). 1 -: control negativo V β 1; A: actina; A-: control negativo actina.

B. 1. 2- Expresión de cadenas V β en bazo de animales controles

Con el objetivo de verificar el acervo genético de los ratones C3H/HeN que estábamos utilizando, en la primera parte del trabajo se realizó la caracterización de la expresión de las cadenas V β del TCR en animales controles. Para ello, se utilizaron bazos de ratones no infectados de las cepas C3H/HeN (*Mls-1^{b2a}*), Balb/c (*Mls-1^b*) y Balb/c línea-10 para analizar el uso relativo de las distintas familias TCRV β por dot-blot e hibridación de los productos de PCR. Distintas cepas de ratones poseen integrados en su genoma distintos Mtv (mouse mammary tumor viruses) que actúan como superantígenos y en combinación con moléculas del CMH II se pegan específicamente a determinados elementos V β del TCR induciendo su delección parcial o total durante el desarrollo linfocitario en timo (Marrack y col, 1993). Ratones de la cepa C3H/He poseen integrados en su genoma los Mtv 1, 6, 8, 11 y 14, que inducen la delección de V β 3 (Mtv6), V β 5 (Mtv6 y 8) y V β 11 (Mtv 8, y 11), lo cual explica la no visualización de estas cadenas en geles teñidos con BrEt como se ejemplifica en la Figura 9. Los ratones de la cepa Balb/c presentan Mtv 6, 8 y 9 y en consecuencia no expresan (o lo hacen en forma restringida) las cadenas V β 3 (Mtv6), V β 5 (Mtv6 y 8), V β 11 (Mtv8 y 9) y a veces V β 12 (Mtv ?) (Tomonari y col, 1993). La línea Balb/c-10 además posee una delección que resulta en la falta de expresión de V β 14 (Buggiano, 1997). Los resultados obtenidos luego de analizar el uso relativo de los productos de PCR hibridados con una sonda marcada con DIG mostraron que las cadenas con expresión teóricamente restringida presentaban un uso relativo <4,28% (Figura 10).

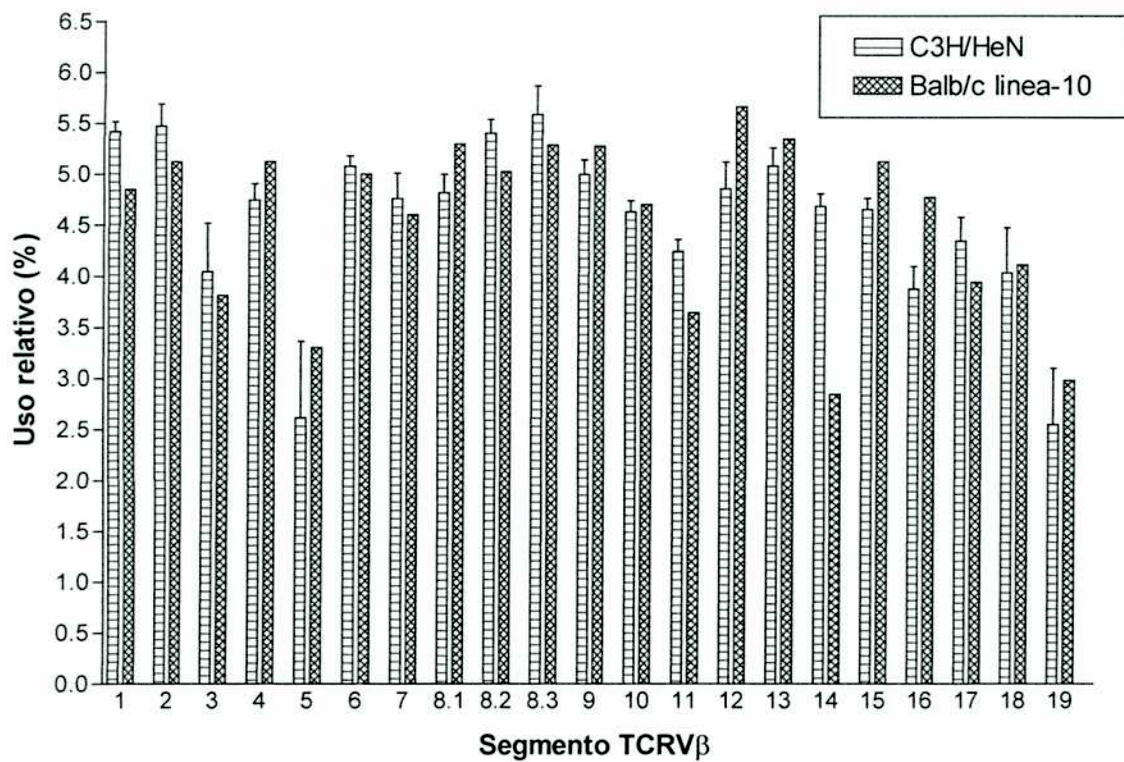


Figura 10. Patrón de expresión de cadenas Vβ del TCR en bazo de animales controles. Los valores de uso relativo fueron calculados según se indicó en Materiales y Métodos a partir de las densidades ópticas resultantes de la hibridización de los productos de RT-PCR con una sonda marcada con DIG. Uso relativo esperado: 4,28 - 5,24 %. C3H/HeN: n=3; Balb/c línea-10: n=2.

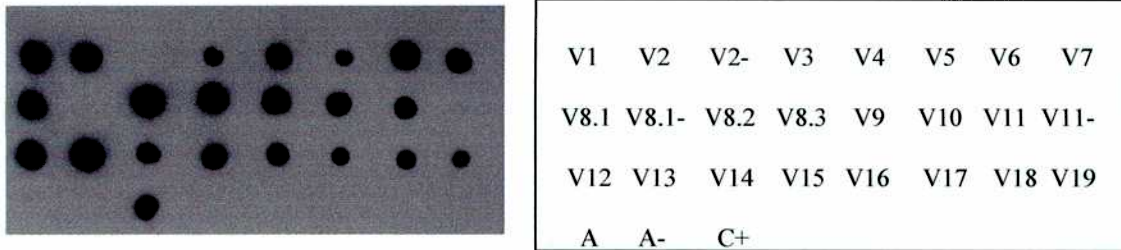


Figura 11. Placa autorradiográfica mostrando el patrón de hibridización obtenido para bazo control C3H (izquierda). En el esquema de la derecha se detalla el orden de sembrado de los distintos productos TCRV β luego de la amplificación por PCR.

La detección de la totalidad de las cadenas es acorde con la alta sensibilidad de la técnica utilizada (Figura 11). En estos estudios también pudo observarse que las cadenas V β 1, V β 2, V β 8.2 y V β 8.3 son usadas preferencialmente por la cepa C3H/HeN (uso relativo >5.24%) (Figura 10). Descartamos que esto se deba a una mayor eficiencia en el apareamiento de los *primers* ya que para los ratones de la cepa Balb/c algunas de las cadenas con mayor uso relativo son diferentes: V β 8.1, V β 8.3, V β 12 y V β 13 (Figura 10); estos últimos resultados coinciden con lo hallado por otros autores (Sunnemark y col, 1998). Con respecto al segmento V β 19, hemos tenido algunas dificultades en su detección (para ambas cepas de ratones y en todos los tejidos) probablemente en este caso debido a las características de los *primers*. Resulta llamativo también el uso relativo de los segmentos V β 16 y V β 18 que es más bajo del esperado en animales C3H/HeN.

En base a los valores de uso relativo obtenidos para bazo de animales C3H/HeN controles, se estableció un rango (media \pm 2DE) dentro del cual se considera que un determinado segmento TCRV β posee un uso relativo normal en esta cepa de ratones (Tabla 5). Segmentos TCRV β con valores por encima o debajo del rango se considerarán sobre-expresados (uso relativo aumentado) o sub-expresados (uso relativo disminuído), respectivamente, en animales infectados.

Tabla 5. Valores de uso relativo de los segmentos del TCR determinados para bazo de animales C3H/HeN no infectados y rango establecido como “uso relativo normal” para cada cadena del TCR a partir de los primeros valores.

Segmento TCRV β	Uso relativo en bazo control (media \pm DE)	Rango uso relativo normal
		Media [+2DE // -2DE]
1	5,41 \pm 0,10	5,75 - 5,07
2	5,47 \pm 0,22	6,23 - 4,71
3	4,04 \pm 0,47	5,68 - 2,4
4	4,74 \pm 0,16	5,28 - 4,2
5	2,62 \pm 0,75	5,2 - 0,04
6	5,08 \pm 0,10	5,44 - 4,72
7	4,76 \pm 0,25	5,62 - 3,9
8.1	4,81 \pm 0,14	5,45 - 4,17
8.2	5,40 \pm 0,28	5,86 - 4,94
8.3	5,58 \pm 0,28	6,54 - 4,62
9	4,99 \pm 0,14	5,49 - 4,49
10	4,63 \pm 0,11	5,01 - 4,25
11	4,24 \pm 0,12	4,66 - 3,82
12	4,85 \pm 0,26	5,77 - 3,93
13	5,05 \pm 0,14	5,54 - 4,57
14	4,68 \pm 0,12	5,1 - 4,26
15	4,65 \pm 0,11	5,03 - 4,27
16	3,87 \pm 0,22	4,65 - 3,09
17	4,34 \pm 0,24	5,16 - 3,52
18	4,03 \pm 0,44	5,57 - 2,49
19	2,55 \pm 0,55	4,45 - 0,65

B. 1. 3- Expresión de cadenas V β del TCR en ratones crónicamente infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi*

Una vez establecido el patrón de expresión en bazo de animales controles, analizamos el patrón de expresión de cadenas V β del TCR en bazo, músculo esquelético, médula espinal y nervio ciático de ratones crónicamente infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi*.

En **bazo**, tejido generalmente representativo de la expresión periférica, no se registraron diferencias en el número de segmentos TCRV β expresados entre los animales controles ($20,5 \pm 0,29$, $n=3$) y los grupos infectados (RA: $18,2 \pm 0,97$, $n=5$; CA-I: $20,3 \pm 0,66$, $n=3$) (Figura 12). Sin embargo, en ambos grupos de animales infectados se detectó un uso relativo aumentado del segmento TCRV β 13 (RA: $5,83 \pm 0,22$; CA-I: $5,59 \pm 0,23$) y un uso relativo disminuído del segmento TCRV β 14 (RA: $2,34 \pm 0,52$; CA-I: $3,97 \pm 0,41$) (Figura 13). Otros segmentos TCRV β se encontraron sobre-expresados específicamente para cada cepa de *T. cruzi*. V β 4, 6, 15 y 16 para CA-I y V β 1, 8.1, 8.2 y 10 para RA (Figura 13).

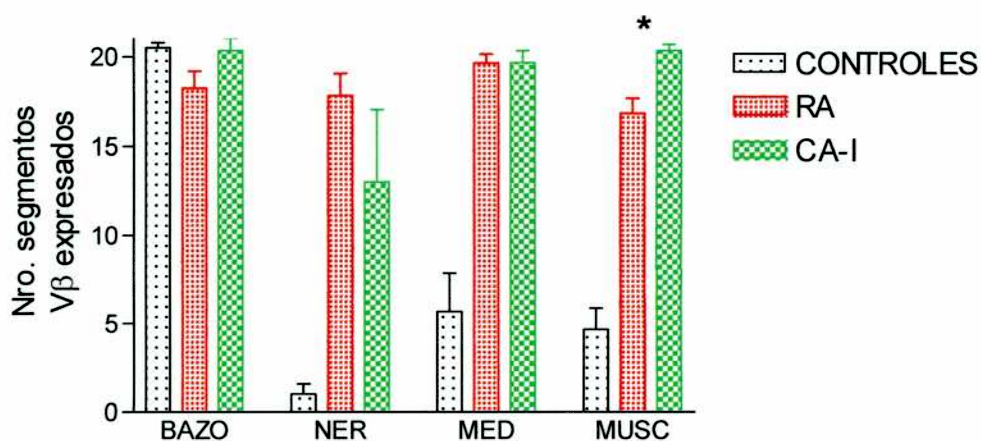


Figura 12. Segmentos TRCV β detectados en tejidos de ratones controles y crónicamente infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi*. *: $p < 0,05$; RA vs. CA-I, *t* test.

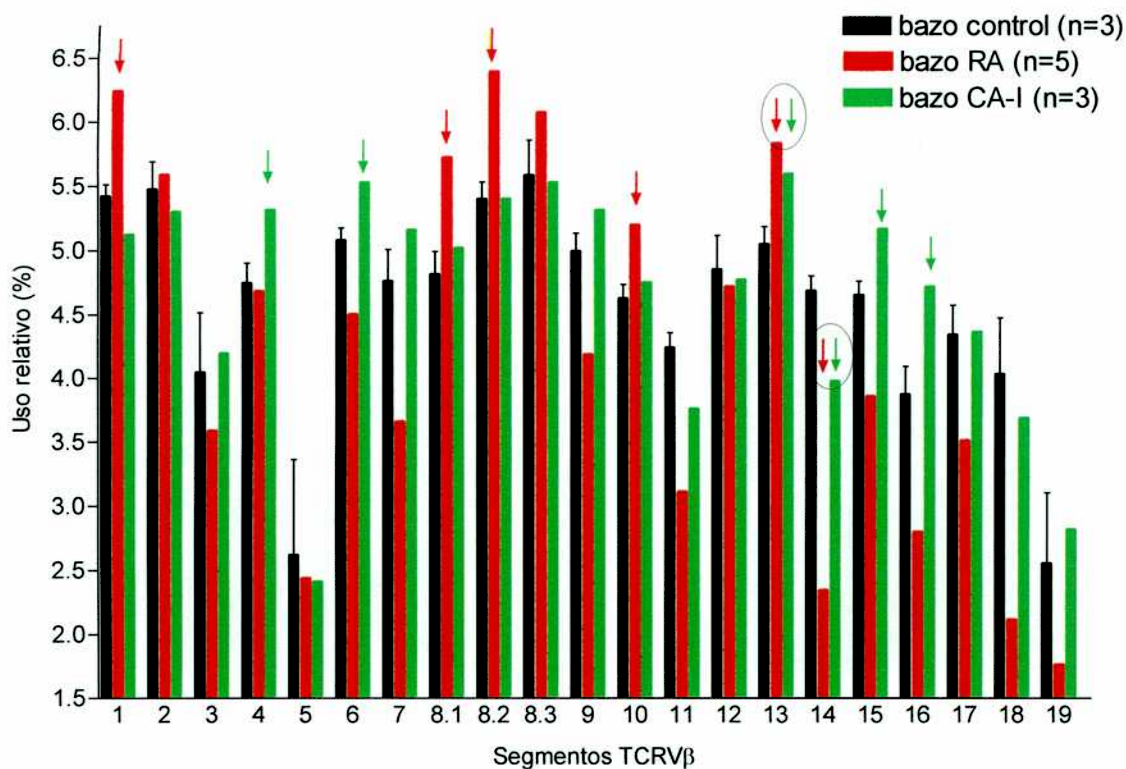


Figura 13. Expresión de cadenas Vβ del TCR en bazo de animales controles e infectados. El valor de uso relativo de cada uno de los segmentos fue calculado según se indicó en Materiales y Métodos a partir de las densidades ópticas resultantes de la hibridización de los productos de RT-PCR con una sonda marcada con DIG. Los segmentos que presentan uso relativo aumentado o disminuido en animales infectados en relación al control están señalados con flechas.

En los tejidos que conforman nuestro modelo de sistema nervioso, el número de segmentos TCRV β expresados en animales controles fue muy restringido (médula: $5,67\pm 2,19$; músculo: $4,67\pm 1,2$; nervio: $1\pm 0,58$) (Figura 12). Por el contrario, en los animales infectados, casi todas las familias TCRV β estaban representadas, reflejando la presencia de un importante infiltrado inflamatorio tisular en animales crónicamente infectados. Se detectó un mayor número de segmentos TCRV β en músculo de animales infectados con la cepa CA-I comparado con las familias representadas en el mismo tejido en animales infectados con la cepa RA (CA-I: $20,33\pm 0,33$; RA: $16,8\pm 0,86$; $p < 0,05$, test *t*). Por otro lado, se observó una tendencia a expresar mayor número de segmentos TCRV β en nervio en animales infectados con RA ($17,8\pm 1,24$) que en los infectados con CA-I ($13\pm 4,04$), aunque sin diferencias significativas entre cepas. En médula, casi la totalidad de las familias fueron representadas tanto en animales infectados con RA ($19,60\pm 0,51$) como con CA-I ($19,67\pm 0,66$) (Figura 12).

El análisis del uso relativo de los distintos segmentos TCRV β en los distintos tejidos evidenció que, en general, la sobre-expresión de un determinado segmento V β en músculo, médula ó nervio era coincidente con un uso relativo aumentado del mismo segmento en bazo del mismo grupo de animales (Figuras 13-16). Así, por ejemplo, para los animales infectados con la cepa CA-I se detectó la sobre-expresión del segmento V β 16 en músculo (Figura 14) y de V β 4 en médula (Figura 15), ambos segmentos también sobre-expresados en bazo de estos animales (Figura 13). Para el caso de los animales infectados con la cepa RA, se observa un uso relativo aumentado del segmento V β 8.1 en músculo (Fig 14), de los segmentos V β 8.1, 8.2, 10 y 13 en médula (Fig 15) y del segmento V β 8.2 en nervio (Fig 16), todos también con uso relativo aumentado en bazo de los mismos animales (Fig 13). Además, se observó un mayor uso relativo para cada uno de los segmentos V β en músculo –respecto del uso relativo en nervio- en los animales infectados con CA-I mientras que en los infectados con RA, se detectaron valores similares para los diferentes segmentos en nervio y músculo (Figura 17 A y B).

Sin embargo, se detectó la sobre-expresión del segmento TCRV β 9 en músculo en los animales infectados con la cepa CA-I ($5,52\pm 0,14$; Figura 14) y en médula ($5,90\pm 0,19$;

Figura 15) y nervio ($5,49 \pm 0,27$; Figura 16) en los infectados con RA, sin observarse un uso relativo aumentado de este segmento en bazo (RA: $4,18 \pm 0,78$; CA-I: $5,31 \pm 0,12$). Resulta interesante que los tejidos donde se determina la sobre-expresión de V β 9 son los tejidos blanco de daño para cada cepa de *T. cruzi*. El segmento TCRV β 9 no fue detectado en ninguno de estos tejidos en los animales controles.

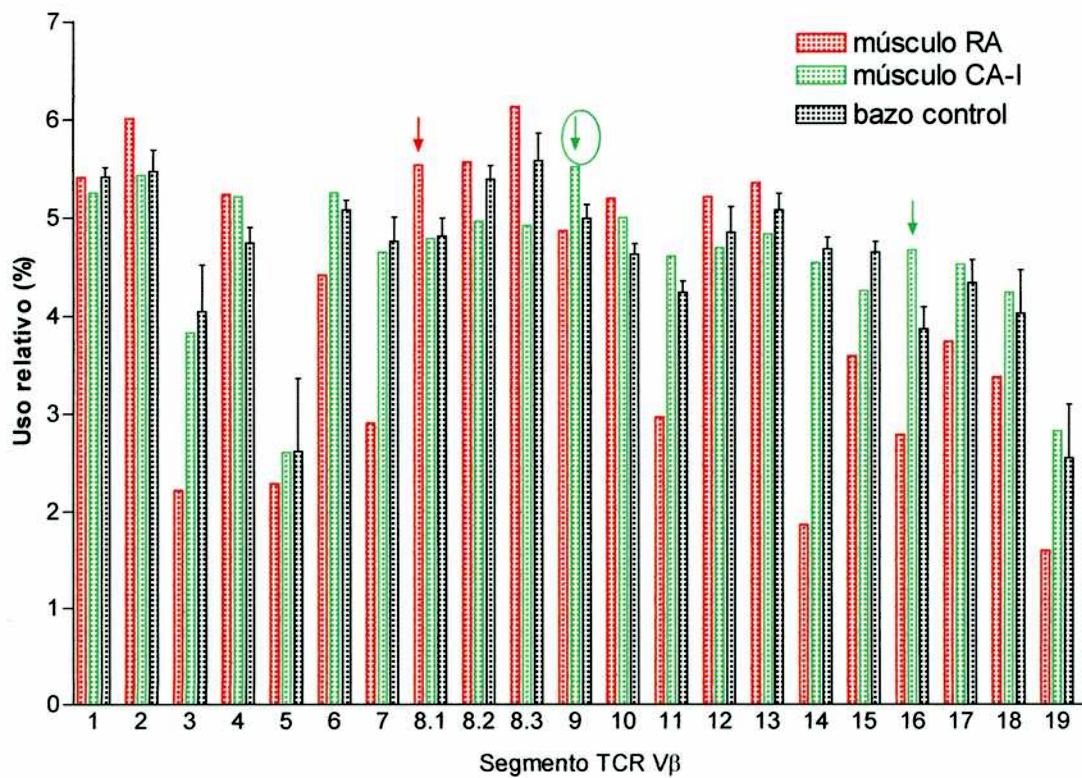


Figura 14. Uso relativo de segmentos TCRV β en músculo de animales infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi* y su relación con la expresión de los mismos segmentos en bazo de animales controles. Los segmentos con uso relativo aumentado están señalados con flechas; músculo RA: n=5; músculo CA-I: n=3; bazo control: n=3.

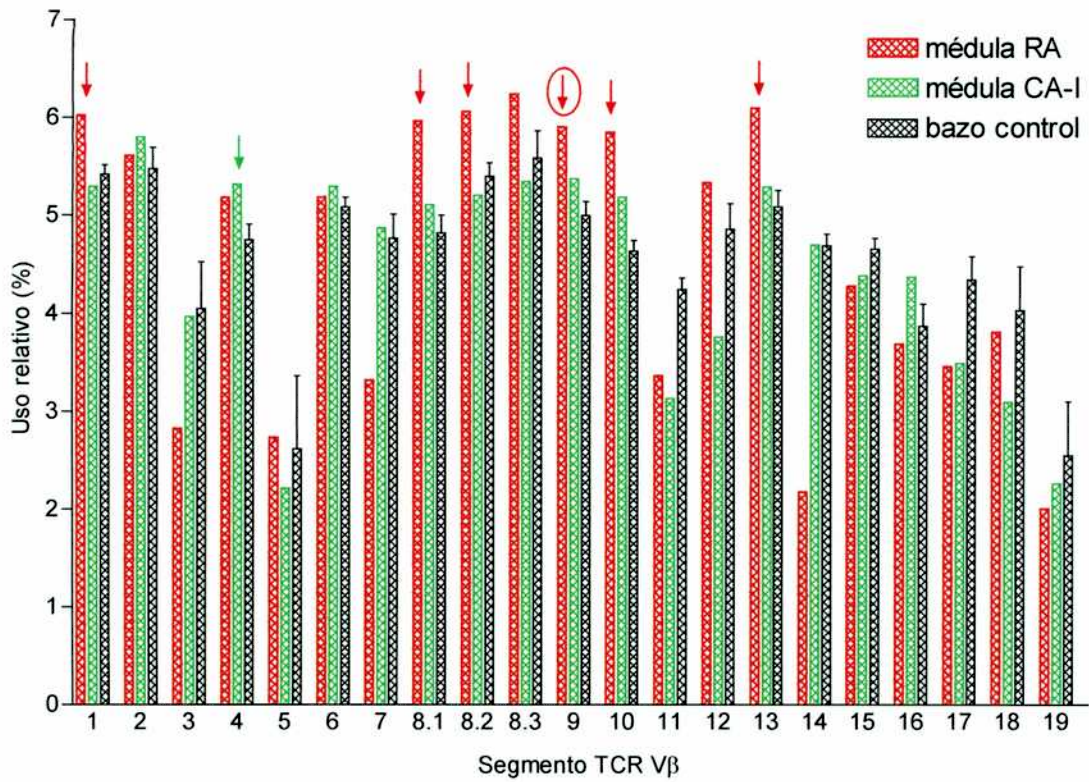


Figura 15. Uso relativo de segmentos TCRVβ en médula de animales infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi* y su relación con la expresión de los mismos segmentos en bazo de animales controles. Los segmentos con uso relativo aumentado están señalados con flechas; médula RA: n=5; médula CA-I: n=3; bazo control: n=3.

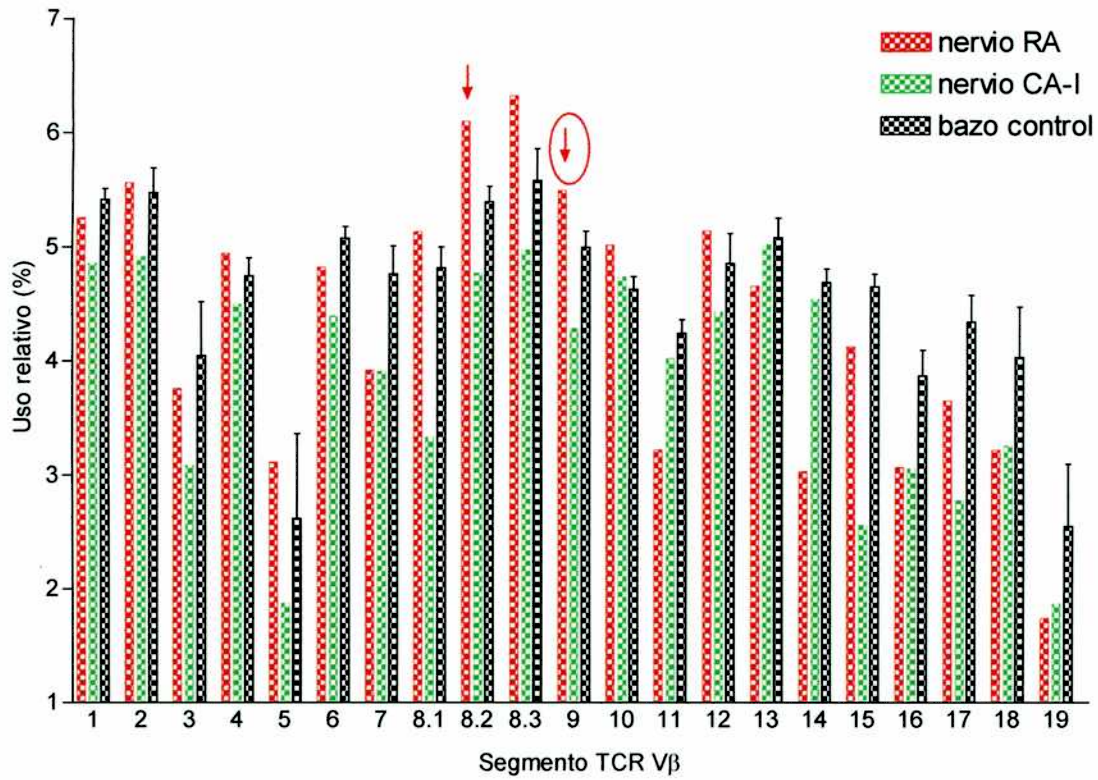


Figura 16. Uso relativo de segmentos TCRVβ en nervio de animales infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi* y su relación con la expresión de los mismos segmentos en bazo de animales controles. Los segmentos con uso relativo aumentado están señalados con flechas; nervio RA: n=5; nervio CA-I: n=3; bazo control: n=3.

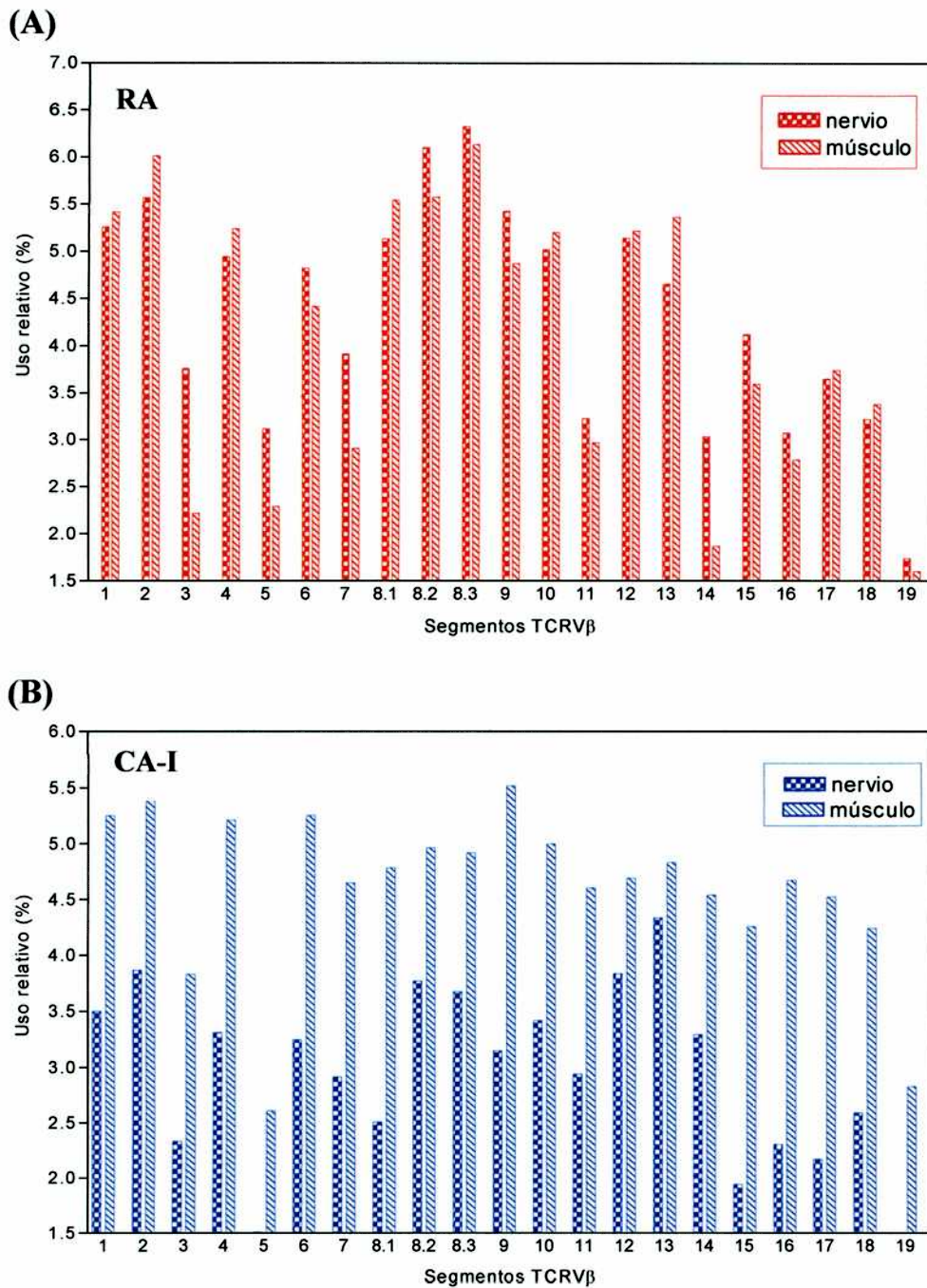


Figura 17. Uso relativo de los segmentos TCRV β en músculo y nervio de animales infectados con las cepas RA (A) y CA-I (B) de *T. cruzi*.

B. 2- Análisis de secuencias de la región CDR3 del TCR

Entre las CDR (*complementarity determining regions*) definidas para los TCR, la región CDR3 es la que muestra mayor diversidad y la involucrada en la interacción y reconocimiento del Ag presentado en contexto del CMH. Aunque la zona CDR3 es generalmente definida como la región que comienza en el residuo aminoacídico luego de la secuencia CASS presente en la mayor parte de los segmentos V β y que termina antes de la secuencia GXG en la región J β , en el presente trabajo se incluye también el segmento J β completo en los análisis de homología de secuencias (Kim y col, 1998b). El polimorfismo de las secuencias del CDR3 para LT que utilizan un segmento particular TCRV β permite determinar si existen clones representados mayoritariamente -generalmente reconociendo unos pocos Ag- cuando se detecta dominancia clonal. La dominancia clonal es definida como la presencia de secuencias nucleotídicas idénticas en $\geq 50\%$ del total de secuencias analizadas (Halapi y col, 1997). En principio, en el presente trabajo se quiso evaluar esta hipótesis para LT que presentaban un uso relativo aumentado en los tejidos blanco de daño para cada cepa: LT TCRV $\beta 9$ de nervio y médula espinal de ratones infectados con la cepa RA y LT TCRV $\beta 9$ de músculo de los animales infectados con CA-I. También se evaluó el polimorfismo del CDR3 en LT TCRV $\beta 9$ en tejidos no blanco de daño y en LT TCRV $\beta 9$ y V $\beta 13$ de bazo de animales controles e infectados.

Ya que es conveniente realizar estos estudios individualmente para cada animal, y la metodología es muy tediosa, sólo se empleó un número restringido de animales para el clonado y secuenciación de los productos de PCR. Se eligieron los productos TCRV $\beta 9$ de los animales que presentaban mayor sobre-expresión de este segmento en los tejidos blanco de daño (RA: 6/II; CA-I: II-3). Por consiguiente, se clonaron y secuenciaron también los productos TCRV $\beta 9$ y TCRV $\beta 13$ de bazo de los mismos animales. Los productos TCRV $\beta 9$ de los tejidos no blanco de daño, fueron seleccionados de manera tal de poder realizar análisis comparativos posteriores entre secuencias derivadas de tejidos blanco y no blanco de daño del mismo y/o distintos animales.

Del total de clones secuenciados sólo fueron seleccionados para el análisis posterior los cromatogramas que presentaron picos altos y definidos, indicativos de una buena

secuenciación; el detalle del número de clones estudiados en los distintos tejidos y animales se muestra en la Tabla 6.

Las secuencias consenso obtenidas para las regiones constantes TCRV β 9-C β y TCRV β 13-C β luego de analizar los cromatogramas y su traducción en el marco de lectura adecuado se muestran en la Figura 18. Las mismas fueron comparadas con bases de datos mediante el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), detectándose 100% de homología con las secuencias comunicadas para las zonas conservadas de TCRV β 9 y TCRV β 13 de ratón.

Tabla 6. Detalle del número de clones derivados de productos de PCR TCRV β 9 y V β 13 secuenciados y analizados en los distintos tejidos de animales controles e infectados.

Tejido	Animal	Cepa <i>T. cruzi</i> infectante	Segm. TCRV β	Nro. Clones analizados
Bazo	Control	-----	9	6
Bazo	6/II	RA	9	8
Bazo	II-3	CA-I	9	7
Bazo	Control	-----	13	8
Bazo	6/II	RA	13	9
Bazo	II-3	CA-I	13	11
Médula	2/II	RA	9	8
Médula	6/II	RA	9	10
Médula	II-3	CA-I	9	13
Nervio	6/II	RA	9	11
Nervio	0/5	CA-I	9	10
Músculo	2/II	RA	9	8
Músculo	II-3	CA-I	9	9

(A)

L A R V G K P V N L I C S Q T M N H D
Ag ctt gca aga gtt gga aaa cca gtg aat ttg atc tgt tct cag act atg aat cat gat

T M Y W Y Q K K P N Q A P K L L L F Y Y D K I
Acc atg tac tgg tac caa aag aag cca aac caa gca cca aag ctt ctt ctt ttc tac tat gat aag att

L N R E A D T F E K F Q S S R P N N S F C S L
Ttg aac agg gaa gct gac act ttt gag aag ttc caa tcc agt cgg cct aac aat tct ttc tgc tct ctc

Y I G S A G L E Y S A M Y L C A S S.....(N)D(N)J.....
Tac att ggc tct gca ggc cta gag tat tct gcc atg tac ctc tgt gct agc agt.....(n) D (n) J

(B)

Q L P S D R F S A V R P K G T N S T L K
Cag ttg ccc tcg gat cga ttt tct gct gtg agg cct aaa gga act aac tcc act ctc aag

I Q S A K Q G D T A T Y L C A S.....(N)D(N)J.....
Atc gat tct gca aag cag ggc gac aca gcc acc tat ctc tgt gcc agc..... (n) D (n) J

(C)

...T V L E D L R N V T P P K V S L F E P S K A
...act gtt ctc gag gat ctg aga aat gtg act cca ccc aag gtc tcc ttg ttt gag cca tca aaa gca

E I A N K Q K A T L V C L A
gag att gca aac aaa caa aag gct acc ctc gtg tgc ttg gc

Figura 18. Secuencias correspondientes a las regiones constantes de los insertos clonados y secuenciados. Se muestran las secuencias de nucleótidos y la correspondiente secuencia deducida de aminoácidos de (A) zona constante consenso V β 9, (B) zona constante consenso V β 13 y (C) zona constante C β . Las bases y aminoácidos marcados en *itálica* corresponden a la zona final de la mayor parte de los segmentos J β .

B. 2. 1- Polimorfismo del CDR3 en bazo

De manera similar a lo realizado al analizar la expresión de los diferentes segmentos V β del TCR, en esta parte del trabajo también se estudió en una primera etapa el polimorfismo de secuencias del CDR3 en clones derivados de productos de amplificación del segmento TCRV β 9 de bazo de animales controles e infectados.

Cada uno de los 21 clones TCRV β 9 analizados presentó una secuencia única. La secuencia de cada clon fue comparada respecto de la de todos los otros, lo que resultó en un total de 210 pares de secuencias analizadas, sin detectarse 100% de homología entre ninguno de ellos. Este hecho refleja la alta diversidad del repertorio del TCR (y en particular la alta variabilidad de la región CDR3) en bazo (Tabla 7).

Entre los 28 clones TCRV β 13 de bazo analizados se detectaron sólo 2 secuencias idénticas en el animal infectado con CA-I (Tabla 7). No se detectó homología 100% entre clones derivados de distintos animales (259 pares de secuencias) ni entre los clones TRCV β 9 y TCRV β 13.

Tabla 7. Homologías de secuencias en la región CDR3 en bazo de animales controles e infectados con *T. cruzi*.

Animal/ TCRV β (nro. de clones analizados)	Secuencias con homología 100% (nro. de pares analizados)	Secuencias con homología 100% (nro. de pares entre tejidos analizados)
RA/ V β 9 (8)	0 (28)	0 (146)
CA-I/ V β 9 (7)	0 (21)	
Normal/ V β 9 (6)	0 (15)	
RA/ V β 13 (9)	0 (36)	0 (259)
CA-I/ V β 13 (11)	2 (55)	
Normal/ V β 13 (8)	0 (28)	

B. 2. 2- Polimorfismo del CDR3 en tejidos blanco de daño.

En los tejidos blanco de daño para cada cepa de *T. cruzi*, no se hallaron clones con homología 100% en músculo en el animal infectado con CA-I pero si 2 clones con homología 100% en nervio y 3 clones con 100% de homología en médula en el animal 6/II infectado con la cepa RA (Ne1=Ne2, 1 par; Me1=Me6=Me20, 3 pares) (Tabla 8). Más aún, al analizar la homología de secuencia entre los clones de médula y nervio del animal 6/II, se detectó que el clon Ne10 era idéntico a los clones Me1= Me6= Me20 (3 pares de clones idénticos), que el clon Me18 poseía 100% de homología con los clones Ne1=Ne2 (2 pares) y que los clones Ne7 y Me15 (1 par) también presentaban 100% de homología. En total, 10 pares de clones TCRVb9 con secuencias idénticas fueron detectados dentro y entre tejidos de sistema nervioso en el ratón 6/II infectado con la cepa RA (Tabla 8). No se encontró homología 100% entre las secuencias de clones de médula y músculo o entre nervio y músculo (Tabla 8).

Entre las secuencias que presentaron homología 100%, sólo fueron identificados 3 CDR3 distintos; la identidad de secuencias se verificó tanto a nivel aminoacídico como nucleotídico (Tabla 9). Los clones representados por las dos primeras secuencias de la Tabla 9 utilizan el mismo segmento J β 2.1 (subrayado); la diferencia entre las mismas radica en la inserción de nucleótidos en la región (N)D(N)J en la segunda secuencia. La tercer secuencia (clones ME18, NE1 y NE2) utiliza el segmento J β 2.4 (Tabla 9). En resumen, entre los 21 clones TCRV β 9 de nervio y médula del animal 6/II analizados, el 45% de los mismos utilizó uno de los 3 rearreglos del CDR3 que se detallan en la Tabla 9. Todas estas secuencias también fueron detectadas en el bazo del mismo animal, aunque no fueron clones mayoritariamente representados en este último tejido, donde no se encontraron secuencias con 100% homología.

Con el fin de determinar si los clones mayoritarios estaban representados en forma conservada en distintos animales infectados con la misma cepa de *T. cruzi*, también se analizaron 8 clones derivados de productos de PCR TCRV β 9 de médula del animal 2/II. Si bien se hallaron 2 pares de clones con homología 100% (Me5=Me18; Me6=Me20) en este animal, sus secuencias fueron distintas de las detectadas mayoritariamente en el animal 6/II. Más aún, no se encontró ningún par de secuencias idénticas entre los clones TCRV β 9 de médula de estos dos animales (80 pares de clones).

Tabla 8. Homologías de secuencias en la región CDR3 en LT TCRV β 9 en principales tejidos blanco de daño en animales infectados con las cepas RA y CA-1 de *T. cruzi*.

Tejido / animal, cepa infectante (#clones)	# pares secs homología 100%	# pares secuencias analizadas	# pares secs homología 100%	# pares de secuencias analizadas
Nervio / 6/II, RA (11)	1	55 (intra)	6	110 (inter)
Médula / 6/II, RA (10)	3	45 (intra)		
Músculo / II-3, CA-1 (9)	0	36 (intra)	Vs. Méd: 0 Vs. Ner: 0	90 (inter) 99 (inter)

Tabla 9. Secuencias de aminoácidos y nucleotídica de la región CDR3 del TCR de los clones V β 9 expresados con mayor frecuencia en sistema nervioso en el animal 6/II, crónicamente infectado con la cepa RA de *T. cruzi*.

Clones	TCRV β 9	(N) D(N) J β
Ne 10, Me 1, Me 20, Me 6	CASS	H G W D A E Q F F G P G T R L T V cat gga tgg gat gct gag cag ttc ttc gga cca ggg aca cga ctc acc gtc
Ne 7, Me 15	CASS	P Y R N N Y A E Q F F G P G T R L T V cct tac agg aat aac tat gct gag cag ttc ttc gga cca ggg aca cga ctc acc gtc
Me 18, Ne 1, Ne 2	CASS	G T E N T L Y F G A G T R L S V ggg aca gaa aac acc ttg tac ttt ggt ggc acc cga cta tcg gtg

B. 2. 3- Polimorfismo del CDR3 en tejidos no blanco de daño

Por otro lado, también se analizó el polimorfismo de secuencia de la región CDR3 en LT TCRVb9 en los tejidos que no son blancos principales de daño como consecuencia de la infección por ambas cepas de *T. cruzi* (RA: músculo; CA-I: médula y nervio). Sorprendentemente, en estos tejidos sí se encontró dominancia clonal, evidenciada por una proporción mucho más elevada de clones presentando 100% de homología de la que habíamos hallado en los tejidos blanco de daño. Así, en músculo del animal 2/II de un total de 8 clones analizados se detectaron 4 idénticos (Mu8=Mu10=Mu14=Mu20), en nervio de un animal infectado con CA-I (0/5) se detectaron 2 secuencias utilizadas mayoritariamente por 8 de los 10 clones analizados (Ne1=Ne19=Ne5; Ne2=Ne7=Ne9=Ne11=Ne17) y en médula del animal II-3 (n=13) 7 clones con el mismo CDR3 (Me1=Me7=Me9=Me12=Me15=Me16=Me17) y 2 pares de clones presentando homología 100% (Me4=Me11; Me18=Me20) (Tabla 10).

No fue posible encontrar secuencias con 100% de homología entre clones de los distintos tejidos.

Se analizó también la homología de secuencias del CDR3 entre clones derivados del mismo tejido pero de animales infectados con distinta cepa parasitaria así como también entre clones de tejidos blanco y no-blanco de animales infectados con la misma cepa de *T. cruzi*.

Al comparar las secuencias de clones de nervio (110 pares), músculo (72 pares) o médula (234 pares) entre animales infectados con RA y CA-I no se hallaron secuencias con homología 100% (mismo tejido/distinta cepa *T. cruzi*). Tampoco fueron detectadas secuencias idénticas al comparar clones de médula y músculo de un mismo animal infectado con CA-I ni al comparar secuencias de músculo y nervio entre dos animales diferentes infectados con la misma cepa. El resultado de cruzar las secuencias entre músculo y médula en animales infectados con la cepa RA fue diferente dependiendo de que los clones analizados fueran del mismo o distinto animal. Entre 80 pares de clones músculo vs. médula de distintos animales no se encontró ninguna secuencia igual, mientras que al comparar clones de los mismos tejidos pero del mismo animal (2/II, 64 pares) fue posible identificar secuencias con homología 100%; por ejemplo, se halló en médula un clon con la misma secuencia con dominancia clonal detectada en músculo RA 2/II (ver leyenda Tabla 10).

Tabla 10. Secuencia de aminoácidos y nucleotídica de la región CDR3-J β del TCR de clones V β 9 presentando dominancia clonal en tejidos no blanco en animales crónicamente infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi*.

Tejido (Segm. J β)	TCR V β 9	(N) D (N) J β	Frecuencia
Med II-3^a			
J β 1.3	tgt gct agc agt C A S S	cgg gac aat tct gga aat acg ctc tat ttt gga gaa agc cgg ctc att gtt gta gag gat R D N S G N T L Y F G E G S R L I V V E D	7/13 (53,85%)
J β 1.2	tgt gct agc agt C A S S	agt cag gca aac tcc gac tac acc ttc ggc tca ggg acc agg ctt ttg gta ata gag gat ctg S Q A N S D Y T F G S G T R L L V I E D L	2/13 (15,38%)
J β 2.3	tgt gct agc agt C A S S	act cgt agt gca gaa acg ctg tat ttt ggc tca gga acc aga ctg act gtt ctc gag T R S A E T L Y F G S G T R L T V L E	2/13 (15,38%)
Ner 0/5^a			
J β 1.1	tgt gct agc agt C A S S	ccc tca ggg cgc aca gaa gtc ttc ttt ggt aaa gga acc aga ctc aca gtt gta gag gat ctg P S G R T E V F F G K G T R L T V V E D L	5/10 (50%)
J β 2.1	tgt gct agc agt C A S S	aga ggg gac tgg ggg gat gct gag cag ttc ttc gga cca ggg aca cga ctc acc gtc cta gag R G D W G D A E Q F F G P G T R L T V L E	3/10 (30%)
Mus 2/II^b			
J β 2.7	Tgt gct agc agt C A S S	agc ccc ttt gaa cag tac ttc ggt ccc ggc acc agg ctc acg gtt tia gag S P F E Q Y F G P G T R L T V L E	4/8 (50%) ^c

^a animales crónicamente infectados con la cepa CA-I

^b animal crónicamente infectado con RA

^c secuencia también identificada en 1 clon de médula del mismo animal.

B. 3- Detección de material parasitario en tejidos

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indicaban que no es posible transferir patología por transferencia pasiva de LT a los tejidos que no son blanco principal de daño para cada cepa de *T. cruzi*. Entonces, las expansiones clonales encontradas en tejidos no blanco de daño ¿están respondiendo a (y controlando) la presencia del parásito? ¿es posible detectar parásitos en estos tejidos? ¿Y en los tejidos blanco de daño?

Debido a los resultados encontrados con respecto al polimorfismo de secuencias del CDR3, quisimos investigar la presencia del parásito en los distintos tejidos del arco médula-nervio-músculo en animales infectados con *T. cruzi*. Como puede observarse en la Figura 19, fue posible hallar material genético del parásito en todos los tejidos en animales infectados, independientemente de la cepa parasitaria infectante. Sin embargo para lograr la detección en nervio de animales infectados con la cepa CA-I hubo que utilizar nervios de 2 o más animales para que la extracción de ADN permitiera identificar la presencia de *T. cruzi*, indicando la baja cantidad de material parasitario en este tejido.

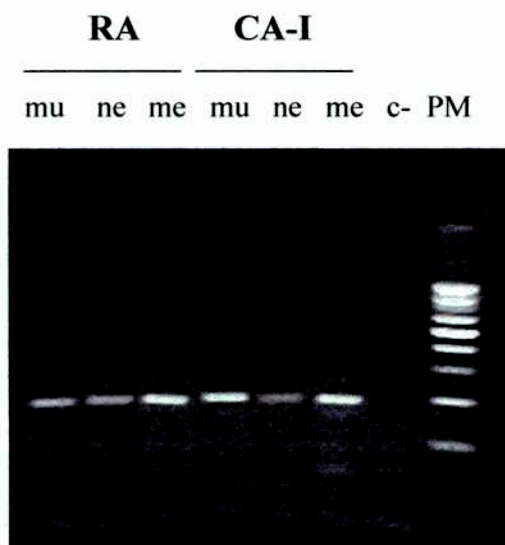


Figura 19. Amplificación de ADN de *T. cruzi* a partir de tejidos de animales crónicamente infectados con las cepas RA o CA-I, utilizando primers TCZ. mu: músculo; ne: nervio; me: médula; c-: control negativo.

B. 4- Análisis de citoquinas pro-inflamatorias *in situ*

Teniendo en cuenta el hallazgo de material genético de *T. cruzi* en todos los tejidos independientemente de la cepa parasitaria infectante, quisimos investigar si existía una respuesta inmune local diferencial que marcara el órgano principalmente injuriado, que depende de la cepa parasitaria infectante. Para ello se estudió la producción de citoquinas IL-1 β , IL-6, TNF α e IFN γ por RT-PCR en los tejidos que comparamos en este modelo de infección por *T. cruzi* y en bazo en animales infectados con cada una de las cepas. Se registró producción de IFN γ (Figura 20A) e IL-1 β (Figura 21A) en todos los tejidos de animales crónicamente infectados. En la mayoría de los tejidos también se detectó producción de IL-6 aunque la producción de esta citoquina fue más importante en nervio en los animales infectados con RA y en músculo en los infectados con CA-I (Figura 21B). Lo mismo se observó en relación a la expresión TNF α (Figura 20B) donde casi no fue posible detectar productos de amplificación en músculo de animales infectados con RA ni en nervio en los infectados con CA-I.

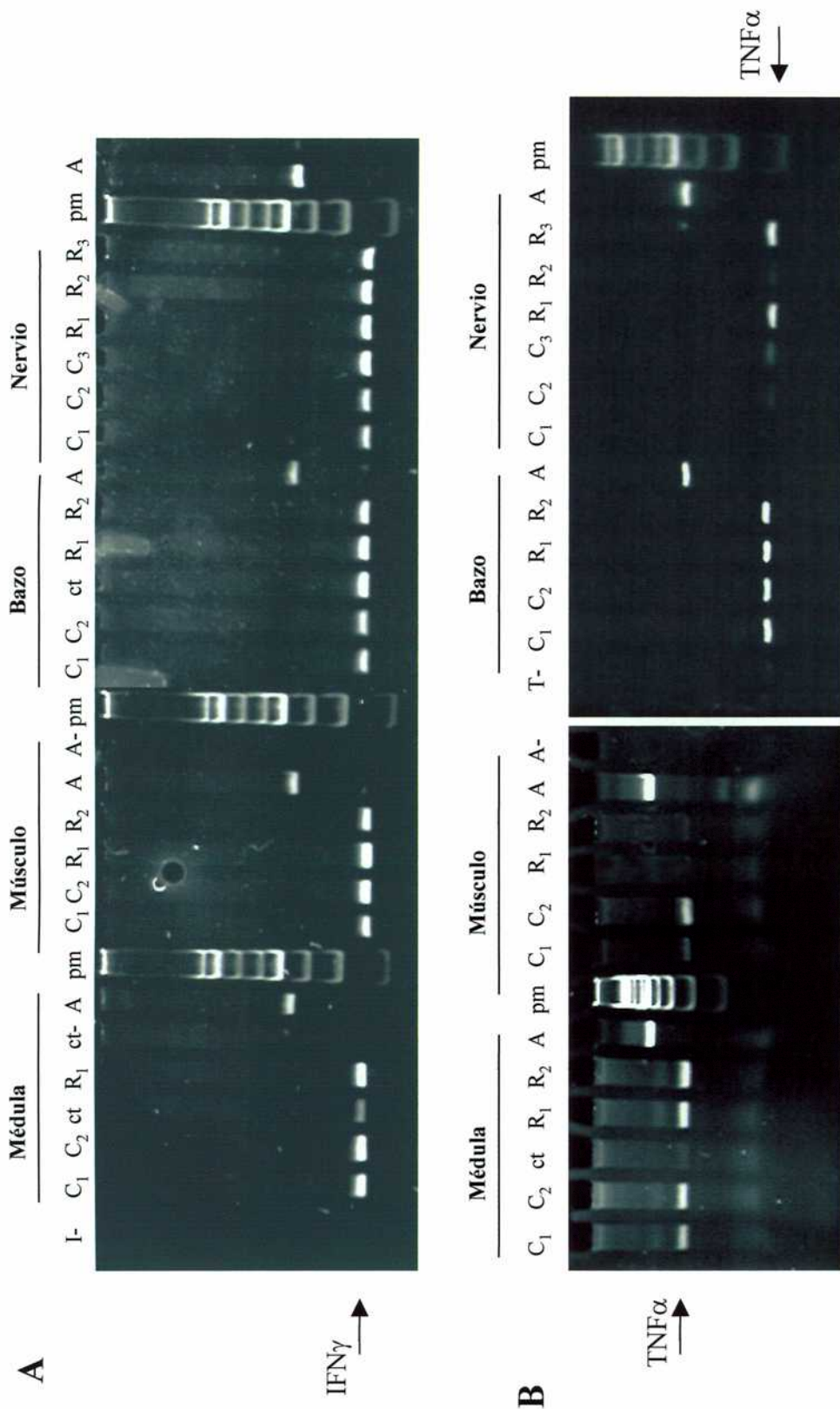


Figura 20. Amplificación por RT-PCR de IFN γ (A) y TNF α (B) en distintos tejidos de animales infectados con las cepas RA (R) o CA-I (C). A: actina; A-: control negativo actina; I- y T-: controles negativos para IFN γ y TNF α , respectivamente, ct: control normal; ct-: control negativo. Los diferentes subíndices indican distintos animales.

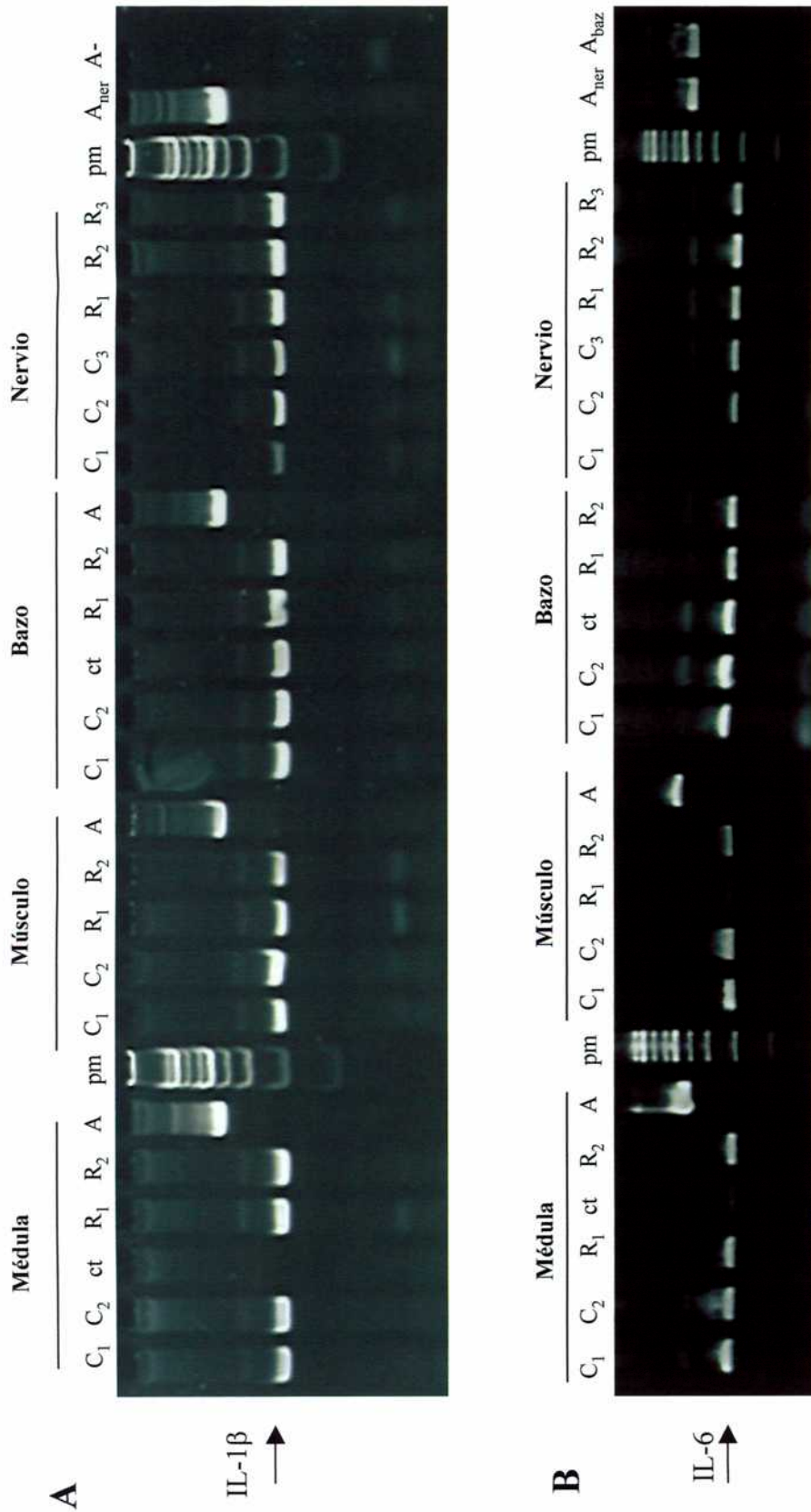


Figura 21. Amplificación por RT-PCR de IL-1 β (A) e IL-6 (B) en distintos tejidos de animales infectados con las cepas RA (R) o CA-I (C). A: actina; A-: control negativo actina; ct: control normal. Los diferentes subíndices indican distintos animales.

Discusión y Conclusiones

La mayor parte de los trabajos indican actualmente que la presencia del parásito *in situ* es necesaria para el desarrollo de patología en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Jones y col, 1993; Vago y col, 1996; Zhang y Tarleton, 1999). Sin embargo, en el huésped inmunocompetente la producción de patología *per se* parecería estar mediada por procesos inmunes (Kalil y Cunha-Neto, 1996; Mirkin y col, 1997; Sunnemark y col, 1998). Hasta el momento, no se ha descrito ningún mecanismo inmunopatogénico exclusivamente parasitario más allá de la lisis celular de los tejidos afectados asociada con la liberación de parásitos y antígenos (Ribeiro dos Santos y col, 1980). Esta característica de la infección no explica en sí misma la patología observada aunque podría contribuir a la presencia de infiltrado inflamatorio. En el presente trabajo detectamos la presencia del *Trypanosoma cruzi* en todos los tejidos lesionados. Sin embargo, la severidad de la patología varía en los diferentes tejidos lo que señala que la misma no depende exclusivamente de la presencia del parásito pero sí de la calidad del infiltrado inflamatorio *in situ*.

Una de las características de la enfermedad de Chagas crónica es la diversidad de formas clínicas conjuntamente con el hecho de que la mayor parte de los individuos infectados permanecen asintomáticos. Esto es sin duda el resultado de la compleja interacción parásito-huésped donde la composición genética de *T. cruzi* y el mamífero –más factores ambientales asociados- se ve reflejada en el grado de virulencia de la cepa parasitaria, por un lado y el grado de susceptibilidad del huésped, por otro. El modelo murino de infección por *T. cruzi* es una herramienta útil para el estudio de la relación parásito-huésped y ha permitido caracterizar cepas de *T. cruzi* de alta y baja virulencia así como también líneas de ratones susceptibles y resistentes a la infección por una determinada cepa parasitaria (Melo y Brener, 1980; Trischmann y col 1978; Trischmann y Bloom, 1982). La adecuada elección de la cepa parasitaria y de la línea murina que se utilicen para establecer la infección experimental permite reproducir la patología crónica humana en los distintos órganos blanco (Postan y col, 1984; 1987; Sanz y col, 1991; Sunnemark y col, 1996). En el presente trabajo se estudió la participación de mecanismos inmunes en la inducción de patología en la enfermedad de Chagas crónica a nivel de lo que denominamos genéricamente sistema nervioso periférico, representado por el arco médula espinal-nervio ciático-músculo isquiotibial. Para ello, se utilizaron dos cepas de *T. cruzi*, RA y CA-I, de alta y baja

virulencia respectivamente, y el huésped murino C3H/HeN en el cual se reproduce, predominantemente, la patología nerviosa o la muscular humana, según la cepa infectante. El estudio de la patología del SNP es de particular importancia en nuestro país, donde se registran alteraciones en este nivel en el 10% de la población infectada (Sica y col, 1995). Además, puede ser útil como aproximación a lo que acontece con el sistema nervioso autónomo, cuyo daño podría preceder a las patologías crónicas cardíacas y digestivas, según sostienen diversos investigadores (Ribeiro y col 2001; revisado por Iosa, 1994 y Lazzari, 1994).

Los procesos observados en la fase crónica de la enfermedad podrían tener relación directa con las anomalías de la respuesta inmune registradas durante la fase inicial de la infección. Durante la fase aguda, la infección por *T. cruzi* desregula el sistema inmune del huésped induciendo activación policlonal linfocitaria, alteración en la producción de citoquinas, secreción de Igs no-específicas e inmunosupresión, desviándose de esta forma la respuesta inmune específica contra el parásito y facilitando su persistencia en el huésped inmunocompetente (Minoprio y col, 1988; 1989a; DosReis, 1997; Freire de Lima y col, 2000; Minoprio, 2001). La inmunosupresión y activación policlonal de linfocitos autorreactivos conjuntamente con la pérdida de tolerancia hacia antígenos propios en la fase aguda podrían ser la base de la respuesta autoinmune presente en el estadio crónico de la enfermedad de Chagas. Se postula que la activación policlonal inespecífica está inducida por mitógenos parasitarios y superantígenos que tendrían un papel importante en la activación de células T y B autorreactivas (Minoprio, 2001). Sin embargo, sólo unas pocas moléculas parasitarias han sido identificadas como responsables de la activación policlonal (Da Silva y col, 1998; Reina-San-Martin y col, 2000). Recientemente, Gao y Pereira (2001) comunicaron que la trans-sialidasa (TS) de *T. cruzi* induce activación policlonal de linfocitos B y T, secreción de Igs, activación de macrófagos y producción de IL-6, que amplificaría la respuesta policlonal. Además, la TS está implicada en mecanismos de adhesión e invasión de la célula huésped (Pereira y col, 1996).

En el modelo murino de infección por *T. cruzi* utilizando las cepas RA y CA-I, la activación policlonal inespecífica se ve reflejada en la alta reactividad contra antígenos de

cerebro, médula y nervio que presentan sueros obtenidos durante la fase aguda de infección (Tekiel y col, 1997). Los mismos sueros no presentan reactividad contra antígenos parasitarios cuando son ensayados por la misma técnica (western-blot) y en la misma dilución (1/200). El menor número de linfocitos circulantes y la expresión disminuída o inhibida de moléculas del CMH II en animales infectados con RA, sirven como ejemplo de la inmunosupresión cepa-específica observada en nuestro modelo durante la fase aguda (Celentano y col, 1995; Alba Soto y col, 2001). Por otro lado, si bien se ha demostrado que ambas cepas de *T. cruzi* expresan TS, no es posible detectar actividad enzimática en suero de ratones infectados con la cepa CA-I. Esto parece ser consecuencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes hallados en animales infectados con el clon K-98, cuyo comportamiento es igual al de la cepa madre CA-I; en la infección con la cepa RA no se encuentran estos anticuerpos durante la fase aguda (Leguizamón y col, 1994). Todos estos hallazgos se relacionan con la alta virulencia y capacidad invasiva de tejidos de la cepa pantrópica RA, reflejo de su mayor tasa de multiplicación intracelular (Celentano, 1996; Mirkin y González Cappa, 2000). Estos resultados –además– concuerdan con los hallazgos de la primera parte de esta Tesis donde se observó que la reactividad hacia antígenos parasitarios en sueros de animales infectados con la cepa RA era menor que la que presentaban los sueros de animales infectados con la cepa CA-I. Por otro lado, aquí demostramos que la proporción de sueros reactivos contra antígenos propios es similar en animales infectados con una u otra cepa de *T. cruzi*. Analizados conjuntamente, estos resultados indican que la proporción entre activación policlonal inespecífica y reactividad específica anti-parasitaria es mayor en animales infectados con la cepa de mayor virulencia.

Como se mencionó en la introducción, son numerosos los trabajos en los cuales se describe la presencia de anticuerpos reactivos contra antígenos propios en la infección por *T. cruzi* en humanos y en modelos animales de la enfermedad de Chagas (revisado por Kierszenbaum, 1999). La existencia de un modelo murino que reproduce adecuadamente las alteraciones del SNP observadas en humanos es sumamente útil para estudiar los mecanismos patogénicos que median o producen el daño. En ratones crónicamente infectados se observa degeneración axonal y desmielinización internodal y paranodal en el nervio ciático, infiltrados perivasculares moderados a intensos en peri- y endoneuro en

animales infectados con RA e infiltrados leves a moderados en los infectados con CA-I (González Cappa y col, 1987; Losavio y col, 1989; Sanz y col 1991; Mirkin y col, 1994). Además, la conducción del nervio ciático está alterada en animales crónicamente infectados, evidenciado por disminución de la amplitud y retraso en el tiempo de latencia del potencial de acción nervioso (PAN) (Losavio y col, 1993).

En nuestro modelo, previamente se había caracterizado la reactividad de sueros contra antígenos del huésped por western blot. Sin embargo, si los anticuerpos presentes en los sueros tuvieran algún papel en la patogenia deberían reconocer epitopes conformacionales y por este motivo se decidió evaluar su reactividad también mediante inmunofluorescencia. Teniendo en cuenta que animales infectados con una u otra cepa de *T. cruzi* presentan principalmente signos de daño primario en músculo o en sistema nervioso, sería de esperar, en principio, que si los autoanticuerpos estuvieran directamente involucrados en patogénesis, la autorreactividad fuera cepa-dependiente. Sin embargo, en la presente Tesis no se detectó una mayor proporción de sueros reactivos contra músculo o nervio entre sueros de una u otra cepa de *T. cruzi*, y los sueros obtenidos de ratones infectados con cualquiera de ambas cepas mostraron el mismo patrón de marcación tisular.

Los postulados para incluir una determinada entidad clínica dentro del término autoinmune incluyen el hecho de poder producir patología por transferencia de células y/o anticuerpos (Rose y col, 1993). Miastenia gravis (MG) es un claro ejemplo de enfermedad autoinmune mediada por anticuerpos que compromete al SNP. Los cambios funcionales del receptor de acetilcolina (AChR) y de la estructura de la membrana post-sináptica están mediados por mecanismos inmunes que son los responsables de las alteraciones en la transmisión neuromuscular observadas en esta enfermedad (Hawke y col, 1996). Las primeras evidencias surgieron al demostrarse que la administración crónica de grandes cantidades de Ig de pacientes con MG resultaba en una disminución de la amplitud de los potenciales de placa miniatura en ratones (Toyka y col, 1975). Posteriormente, Lindstrom y col (1976) reprodujeron los signos clínicos, electrofisiológicos, histológicos y bioquímicos típicos de la enfermedad aguda, 24 hs después de la transferencia de anticuerpos obtenidos de ratas inmunizadas con AChR. En estos estudios los autores también demostraron que la cantidad de anticuerpo requerido para transferir pasivamente la enfermedad era menor que la

necesaria para saturar la totalidad de las moléculas de AchR de la musculatura de la rata y propusieron que el efecto de los anticuerpos estaría amplificado por la activación del complemento y la participación de células fagocíticas. Por otro lado, en el desarrollo de determinadas polineuropatías también ha sido demostrada la participación directa de Igs en patogenia. Por ejemplo, IgM reactivas contra la glicoproteína asociada a mielina inducen desmielinización de los nervios periféricos (Tatum, 1993)

Trabajos recientes demostraron que anticuerpos presentes en el suero de pacientes con infección por *T. cruzi* son capaces de mediar las alteraciones electrocardiográficas típicas de la fase crónica de la enfermedad sin producir daño histopatológico ostensible (De Oliveira y col, 1997; López-Bergami y col, 1997; Masuda y col, 1998).

En la presente Tesis, se demostró que la inyección epineural de sueros de animales infectados con *T. cruzi* modifica la latencia y amplitud del PAN en animales singeneicos receptores de manera similar a lo descrito para ratones infectados. Este efecto fue dependiente de la cepa parasitaria ya que solamente los receptores de sueros obtenidos de animales infectados con la cepa pantrópica/neuropática RA presentaron alteraciones electrofisiológicas. Más aún, entre los sueros RA, sólo aquellos que reconocían antígenos conformacionales de sistema nervioso (RA/Ne+) fueron capaces de inducir aumentos en el tiempo de latencia y disminución de la amplitud. La reactividad contra antígenos propios de la mayor parte de los sueros transferidos por vía epineural había sido caracterizada previamente por western blot. Sin embargo, no se encontró correlación entre la detección de epitopes lineales de antígenos de nervio y capacidad de inducir alteraciones electrofisiológicas.

Las anomalías observadas en las amplitudes del PAN estarían mediadas por IgG ya que anticuerpos purificados de sueros RA/Ne+ inyectados en el epineuro provocan el mismo efecto que el suero completo. Sin embargo, IgG purificada no es capaz de alterar significativamente la latencia. La latencia tampoco se alteró cuando las IgG purificadas se inyectaron conjuntamente con el suero depletado de inmunoglobulinas por lo cual postulamos que la actividad del factor que tiene capacidad de retrasar los tiempos de latencia se pierde en el proceso de purificación de IgG. La presencia de depósitos de IgG,

marcando el curso axonal y/o vainas de mielina detectados 4dpy *ex vivo* en nervios de receptores de sueros RA/Ne+ apoyan los resultados anteriores.

En conjunto, los resultados indican que IgGs presentes en el suero de animales infectados con capacidad de reconocer Ag conformacionales de sistema nervioso estarían involucradas directamente en la inducción de las alteraciones electrofisiológicas.

En general, la disminución en la amplitud del potencial de acción nervioso indica que el número de axones dentro de un nervio está alterado. Sin embargo, en el presente trabajo, la precocidad en la aparición de alteraciones del PAN conjuntamente con la presencia de alteraciones histológicas leves, que no guardan proporción con la severidad de las alteraciones electrofisiológicas, indican que la disminución de la amplitud del PAN no sería consecuencia directa de degeneración axonal sino la expresión de un menor número de axones funcionantes.

A pesar de que hemos encontrado sueros reactivos *in vitro* contra estructuras nativas de antígenos de nervio en animales infectados con una u otra cepa de *T. cruzi*, los sueros obtenidos de animales infectados con la cepa CA-I no fueron capaces de inducir cambios en el PAN ni se detectaron depósitos de IgG *ex vivo* en los receptores al momento de la evaluación electrofisiológica. Estas observaciones podrían reflejar una menor avidéz hacia Ag de sistema nervioso de los sueros CA-I, lo cual también explicaría por qué IgG reactivas anti-nervio *in vitro* no inducen efectos electrofisiológicos *in vivo*.

En un estudio previo, Said y col (1985) comunicaron que nervios inyectados con suero de animales crónicamente infectados no podían ser distinguidos de aquellos inyectados con suero normal. Los autores encontraron sólo unas pocas fibras desmielinizadas en el sitio de la inyección y lo asociaron con procesos de degeneración axonal subsecuentes al trauma post-pinchazo. Sin embargo, en el mencionado trabajo, no se evaluó si los sueros producían algún efecto electrofisiológico. Además, la discrepancia entre esos estudios y los resultados aquí presentados podría deberse a las diferentes cepas de *T. cruzi* utilizadas para infectar a los animales dadores de suero y/o al haber realizado los estudios en distintos tiempos post-inyección.

Por otro lado, en la presente Tesis demostramos que la inyección de parásitos en el epineuro reproduce la "situación" del nervio ciático observada en animales crónicamente infectados pero en tiempos más cortos. Los animales presentaron anomalías en la conducción del nervio y desarrollaron infiltrados inflamatorios a los 17 dpy. En este tiempo py, la infección estaba establecida en ratones inyectados con parásitos de las cepas RA y CA-I, demostrado por la presencia de parásitos circulantes y la detección de ADN de *T. cruzi* en nervios. El hecho de que en el tiempo más corto py analizado (4 días) no se observaran ni alteraciones del PAN ni infiltrados inflamatorios, refleja la baja carga parasitaria en nervio (que no fue detectada incluso por PCR) y la ausencia de diseminación de la infección, reflejada por MHT negativo. A partir de los 10 dpy, fue posible observar parásitos circulantes y tisulares que justifican las anomalías del PAN y la presencia de infiltrados celulares en los nervios inyectados y contralaterales. En el presente trabajo se registraron mayores latencias sin alteraciones en la estructura de la mielina, mientras que en animales crónicamente infectados se ha comunicado tanto el aumento del tiempo de latencia del PAN como desmielinización (González Cappa y col, 1987; Molina y col, 1987; Losavio y col, 1989; Losavio y col, 1993). En consecuencia, postulamos que la presencia de vasculitis, parásitos e infiltrados inflamatorios en los nervios son eventos secuenciales y previos que conducen a la desmielinización durante el progreso de la parasitosis.

Aunque la presencia de parásitos en nervio es suficiente para producir alteraciones electrofisiológicas en SNP, no hemos determinado si las mismas están mediadas por los parásitos *per se* o por el infiltrado celular inflamatorio que se detecta en los nervios parasitados. Sin embargo, en el presente trabajo también se demuestra que los anticuerpos son capaces de inducir alteraciones electrofisiológicas similares en ausencia de parásitos. Esto representa la primera evidencia de la participación directa de anticuerpos en la patología observada en la enfermedad de Chagas crónica a nivel de SNP. No obstante, resta determinar si la persistencia local de antígenos parasitarios es necesaria *in vivo* para mantener en el tiempo la acción de los anticuerpos funcionalmente activos.

En relación con los linfocitos T e injuria tisular en la enfermedad de Chagas crónica, su participación había sido demostrada en nuestro laboratorio (González Cappa y Mirkin,

1994) y por otros grupos (Laguens y col, 1981; Hontebeyrie-Joskowicz y col, 1987) previamente al inicio de la presente Tesis. En nuestro modelo, LT CD4+ y CD8+ de animales infectados con la cepa RA proliferan intensamente frente a antígenos de sistema nervioso y su transferencia pasiva reproduce en los animales receptores daño tisular exclusivamente en médula y nervio. Por otro lado, animales receptores de LT CD4+ obtenidos de donantes infectados con la cepa CA-I, muestran infiltrados inflamatorios en músculo esquelético de forma similar a lo hallado en animales infectados (Mirkin y col, 1997).

En las enfermedades mediadas por linfocitos T, la identificación del repertorio del TCR en muestras de lesiones autoinmunes o lesiones inflamatorias crónicas tiene particular importancia. La detección de la acumulación oligoclonal de células T involucradas en procesos patogénicos de etiología autoinmune podría tener implicancias terapéuticas brindando la posibilidad de revertir dichos desórdenes utilizando inmunoterapia contra determinados productos génicos de la región variable del TCR.

Actualmente, las poblaciones T expandidas se identifican mediante anticuerpos monoclonales (AcMo) contra las diferentes familias TCRV β por citometría de flujo, o utilizando *primers* específicos para cada uno de los segmentos TCRV β y un *primer* común para el segmento C β (Maini y col, 1999). Esta última metodología permite amplificar el cADN de los transcritos V β -D β -J β -C β a partir de ARN total de tejidos, clones de LT o linfocitos de sangre periférica, semicuantificándolos utilizando sondas marcadas. Si bien ambas técnicas (citometría de flujo y RT-PCR) permiten la cuantificación relativa de los segmentos expresados, la citometría de flujo permite también identificar el fenotipo celular de los LT. Por otro lado, la utilización de *primers* específicos y la técnica de RT-PCR resulta más valiosa cuando se quiere analizar la expresión de las cadenas en el sitio de lesión tisular y relacionarlo con la expresión periférica de los mismos segmentos.

En artritis reumatoidea, se ha estudiado el mecanismo que activa y selecciona los LT en el lugar de la inflamación, ya que se atribuye a estas células un papel determinante en la enfermedad. Se ha observado que los LT periféricos presentan un patrón policlonal de expresión de cadenas V β mientras que sólo algunos segmentos son utilizados por LT del

líquido sinovial (Sottini y col, 1991; Paliard y col, 1991). En esclerosis múltiple –otra enfermedad autoinmune mediada por LT- Kotzin y col (1991) encontraron que clones reactivos de pacientes presentaban un uso preferencial del segmento V β 5.2. Sin embargo, Wucherpfenning y col (1991; 1992) comunicaron la sobre-expresión de otro segmento TCRV β (V β 17) y sólo en las placas crónicas de la enfermedad; en las placas activas detectaron un repertorio policlonal. Las discrepancias entre los resultados de ambos grupos de trabajo se atribuyen a variables en las poblaciones de pacientes.

Por otro lado, también se ha demostrado que linfocitos infiltrantes de tumores presentando uso preferencial de determinado rearreglo del TCR podrían representar células efectoras anti-tumor (Weidmann y col, 1992; Peoples y col, 1993; Sensi y Parmiani, 1995).

En relación a la caracterización de la expresión de cadenas del TCR en enfermedad de Chagas, el primer trabajo fue realizado por Cunha Neto y col (1994). Los autores analizaron por RT-PCR e hibridización el número de cadenas expresadas en biopsias y autopsias de corazones humanos, encontrando expresión restringida de segmentos TCRV α (pero no V β). Propusieron que los LT con expresión restringida V α estarían reconociendo una cantidad limitada de antígenos cardíacos y que este hecho favorecería la miocarditis observada en la fase crónica de la enfermedad. Por otra parte, Cardoni y col (1996) analizaron la expresión de 14 cadenas TCRV β en timo y bazo en distintas cepas de ratones con infección aguda y crónica utilizando AcMo y citometría de flujo. En animales con infección aguda observaron aumento y/o disminución en la expresión de diferentes segmentos TCRV β dependiendo de la cepa de ratones utilizada. En animales con infección crónica no detectaron cambios en los órganos analizados respecto de los controles. Posteriormente, Sunnemark y col (1998) -en un modelo de cardiopatía chagásica crónica en ratones CBA infectados con la cepa Tulahuén- comprobaron el uso relativo aumentado de los segmentos TCR V β 8.2 y V β 8.3 en corazón de animales infectados pero no en el mismo tejido de animales no infectados o en bazo de animales infectados. Recientemente, Costa y col (2000) estudiaron la expresión de segmentos TCRV β en sangre periférica de pacientes con infección aguda y crónica. En dicho trabajo, observaron disminución en la expresión de V β 5 en pacientes con infección aguda y aumento del mismo segmento en pacientes con infección crónica con cardiopatía pero no en pacientes en fase indeterminada.

En la presente Tesis se analizó el patrón de expresión de los segmentos TCRV β por RT-PCR en LT infiltrantes de tejidos en el modelo de patología crónica del SNP en ratones C3H/HeN controles y crónicamente infectados con las cepas RA y CA-I de *T. cruzi*. En bazo, órgano generalmente representativo de la expresión periférica, no se registraron diferencias en el número de cadenas expresadas entre los animales controles e infectados. Sin embargo, se observó el uso relativo aumentado y disminuído de los segmentos V β 13 y V β 14, respectivamente, en animales infectados con ambas cepas de *T. cruzi*. Esto sugiere que la expresión de este repertorio periférico podría ser marcador de infección en las condiciones analizadas.

Resulta interesante el hecho de haber sido descripta la sobre-expresión del segmento V β 14 en animales con infección aguda, lo cual podría ser consecuencia de la activación policlonal inespecífica (Cardoni y col, 1996; Leite de Moraes y col, 1994). La inmunosupresión que sigue a la activación policlonal podría relacionarse con la sub-expresión de este mismo segmento en la fase crónica, detectada en el presente trabajo. Por otro lado, en la infección experimental por *T. cruzi* también se describió la sobreexpresión del segmento TCRV β 6 ligada a la resistencia a la infección (Cordeiro da Silva y col, 1996). Si bien la resistencia a la infección es un parámetro relativo a la invasividad de tejidos y sobrevida de los animales, es significativo que la sobre-expresión de este segmento también se observe en nuestro modelo en los animales infectados con la cepa de baja virulencia CA-I.

En los tejidos que conforman nuestro modelo de sistema nervioso, el número de segmentos TCRV β expresados en animales controles fue muy restringido. En los animales infectados, los resultados reflejan la presencia de un importante infiltrado inflamatorio en los tejidos blanco de daño, detectándose mayor número de segmentos representados en músculo en los infectados con CA-I y una tendencia a expresar mayor número de segmentos en nervio en los infectados con RA, siendo ambos tejidos los más inflamados como consecuencia de la infección con estas cepas de *T. cruzi* (Mirkin y col, 1994). Además, se observó un mayor uso relativo para cada uno de los segmentos V β en músculo –respecto del uso relativo en nervio- en los animales infectados con CA-I, que reflejaría el comportamiento principalmente miotrópico de esta cepa. En los animales infectados con RA, se encontraron

valores de uso relativo de los distintos segmentos TCRV β similares en nervio y músculo, otro ejemplo de la naturaleza pantrópica de la cepa RA.

Por otro lado, se registró sistemáticamente la sobre-expresión del segmento TCRV β 9 en nervio y médula de los animales infectados con RA y en músculo en los infectados con CA-I, independientemente del uso relativo de este segmento en bazo. Podría especularse que el uso relativo aumentado marca el órgano blanco de daño para cada cepa. La existencia de un patrón de expresión diferencial de los segmentos TCRV β en el sitio de lesión respecto de la expresión periférica aquí encontrados es compatible con lo comunicado para otras enfermedades mediadas por procesos inmunes (revisado por Gold, 1994).

Si bien los resultados arriba mencionados demuestran la estimulación preferencial del segmento TCRV β 9 en los tejidos blanco de daño, estas expansiones podrían ser de naturaleza policlonal, por ejemplo, cuando son estimuladas por superantígenos (Maini y col, 1999). La existencia de superantígenos ha sido recientemente propuesta (aunque no probada) en la infección por *T. cruzi* (Minoprio, 2001).

Estudios previos realizados en esclerosis múltiple, en los que se detectaba uso preferencial del segmento V β 5.2, llevaron a la implementación de un protocolo de tratamiento a doble ciego en pacientes utilizando péptidos contra dicho segmento. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes, ya que si bien los pacientes respondedores permanecieron en una situación clínica estable, la mayoría no respondió a la inmunización y su estado clínico empeoró (Vandenbark y col, 1996). De hecho, la condición necesaria para poder implementar terapias inmunomodulatorias requiere la demostración de especificidad restringida de los segmentos V β sobre-expresados.

Los genes codificantes para las cadenas del TCR $\alpha\beta$ son producidos por la combinación de segmentos V, D, J y C, de manera similar a lo que sucede para la generación de anticuerpos. La combinación aleatoria de los distintos segmentos V β , D β , J β y C β da como resultado $2,25 \times 10^6$ diferentes receptores V β -C β (Arstila y col, 1999; Casrouge y col, 2000). Sin embargo, el aporte mayor a la diversidad del TCR se debe a mecanismos que incluyen deleciones o inserciones de nucleótidos en las regiones de recombinación V-D y D-J, diversidad en la zona de unión V-D-J, etc, mecanismos conocidos en su conjunto

como “junctional diversity”. Zonas hipervariables, conocidas como CDR, han sido definidas en los TCRs. La región CDR3 en la cadena β del TCR -que incluye la parte final de la región V, el segmento D completo y la parte inicial del segmento J- es la que muestra mayor diversidad y la involucrada en el reconocimiento del antígeno (Pannetier y col, 1993). El análisis del polimorfismo del CDR3 permite determinar si existen clones mayoritarios dirigidos hacia uno o unos pocos antígenos ya que clones de LT con secuencias nucleotídicas idénticas en esta región poseen la misma especificidad antigénica.

Nuevos desarrollos metodológicos facilitaron el análisis de poblaciones que responden en forma clonal. Algunos métodos permiten el análisis global detectando variaciones en el tamaño de la región CDR3. Otros, permiten determinar la frecuencia clonal de secuencias específicas del CDR3 mediante el clonado y secuenciación de productos de PCR de la familia TCRV β expandida (Maini y col, 1999).

El estudio de los mecanismos patogénicos de la encefalomiелitis autoinmune experimental, modelo animal de la esclerosis múltiple, permitió confirmar que linfocitos infiltrantes de médula presentaban sobreexpresión del segmento V β 8.2 durante todo el curso de la enfermedad (Kim y col, 1998a; 1998b). Esto había sido previamente demostrado *in vitro* para clones reactivos con la proteína MBP, inductora de la enfermedad en animales (Urban y col, 1988). La secuenciación de los LTV β 8.2 expandidos mostró que los clones encefalitogénicos involucrados en patología presentaban secuencias predominantes en la región CDR3 (Kim y col, 1998 a; 1998 b). Posteriormente, el mismo grupo de trabajo comunicó la sobreexpresión de LT V β 8.2 y V β 10 en un modelo de miocarditis autoinmune. La secuenciación de segmentos sobreexpresados y la determinación de dominancia clonal en la región CDR3, permitió la implementación de inmunoterapias utilizando AcMo anti-V β 8.2 y V β 10 y vacunas a ADN. Los resultados demostraron disminución de la severidad de la enfermedad o incluso la ausencia de infiltrados inflamatorios (Matsumoto y col, 2000).

Los resultados obtenidos en la presente Tesis muestran una alta proporción de clones TCRV β 9 idénticos en animales infectados con RA en los tejidos blanco de daño, aunque no se detectó dominancia clonal. Dado que la homología de secuencias fue compartida por

clones de nervio y médula -tejidos en los que era posible reproducir la patología por transferencia de LT en ausencia de parásitos- la presencia de secuencias conservadas en el CDR3 podría estar indicando la presencia de clones mayoritarios autorreactivos en el sitio de lesión.

La alta heterogeneidad de secuencias de la región CDR3 de productos TCRV β 9 y V β 13 en bazo de animales controles e infectados es acorde con lo esperado para un órgano linfático secundario. Además, el hecho de no haberse encontrado en este órgano secuencias idénticas en los animales infectados con RA y sólo 2 secuencias con homología 100% en el animal infectado con CA-I para el segmento TCRV β 13, sugeriría que la sobreexpresión sistémica de este segmento podría estar mediada por una molécula con características similares a un superantígeno.

Sorprendentemente, sí se detectó dominancia clonal (\geq 50% secuencias idénticas) en los tejidos que no son blanco principales de daño para cada cepa de *T. cruzi*. Esto, sumado a la imposibilidad para reproducir patología por transferencia pasiva de células en estos tejidos y al hallazgo de material genético parasitario en ellos, sugiere que los clones mayoritarios hallados estarían dirigidos contra antígenos de *T. cruzi* y no contra antígenos tisulares. Avala también esta hipótesis la presencia, en tejido blanco de daño (médula RA), de secuencias idénticas a las mayoritariamente expresadas en el tejido no blanco de daño cuando se analizaron clones del mismo animal.

En todos los casos en que se encontró una alta proporción de clones con homología 100% en la región CDR3, la identidad de secuencias fue establecida individualmente para cada animal. Esto podría indicar que los LT infiltrantes de tejidos están reconociendo diferentes antígenos en distintos animales o que cada animal amplificó preferencialmente distintos clones con capacidad de reconocer el mismo antígeno (Mason, 1998). Este hecho ha sido frecuentemente observado en LT infiltrantes de lesiones autoinmunes, donde se detecta un repertorio paciente-específico de clones T que reconocen el mismo antígeno, a menudo en el contexto de un mismo HLA (revisado por Gold, 1994).

La sobre-expresión de familias TCRV β en linfocitos infiltrantes de tumores generalmente resulta en expansiones oligoclonales mientras que –en general- el patrón de linfocitos periféricos es policlonal. La concentración local de transcritos recurrentes, en distintas

lesiones del mismo paciente, sugiere una proliferación inducida por antígenos específicos y/o el reclutamiento de células T oligoclonales en el sitio del tumor (Sensi y Parmiani, 1995). Sin embargo, también se han detectado células T con reactividad anti-tumor expandidas clonalmente en familias TCRV β que no presentaban uso relativo aumentado. En este sentido, Halapi y col (1997) hallaron expansiones de clones T CD8 preferencialmente en pacientes con baja carga tumoral. La determinación de clonalidad del CDR3, demostró que el reconocimiento del tumor estaba mediado por clones con segmentos TCRV β no sobre-expresados pero que presentaban homología de secuencia en la región CDR3. La definición molecular de los epitopes tumorales (o parasitarios en nuestro caso) que dirigirían las expansiones clonales *in vivo* necesitan ser establecidas.

En *T. cruzi* se han caracterizado 3 superfamilias de proteínas de superficie (TS, TS-like y mucinas) que recubren la mayor parte de la superficie del parásito (revisado por Campetella y col, 1992; Frasch, 2000; Acosta-Serrano y col, 2001). La expresión de la mayoría de estas familias ha sido detectada en tripomastigotes y epimastigotes. Sin embargo, la familia Tc-85, perteneciente a la superfamilia TS-like, recubre también la superficie de amastigotes. Las proteínas de esta familia -también denominada SA-85, ASP, TSA1, etc.- son codificadas por más de 100 genes. La expresión simultánea de un número variable de estas proteínas se ha postulado como un mecanismo de evasión de la respuesta T por parte del parásito (Kahn y Wleklinski, 1997; Kahn y col, 1990). Sin embargo, recientemente Millar y Khan (2000) comunicaron que la proteína SA85-I.1 es un antígeno dominante de células T. También se ha demostrado que las proteínas ASP-1 y ASP-2, presentes en la superficie de amastigotes, son liberadas al citoplasma de la célula huésped, expresadas en contexto CMH I y blanco de LT CD8 (Low y col, 1998). En nuestro modelo, sería interesante poder determinar si los clones mayormente expresados en los tejidos no blanco de daño están dirigidos contra alguno/s de estos antígenos mayoritarios expresados en la superficie del parásito.

Distintos factores pueden influir el desarrollo de células CD4 en Th1 o Th2. Entre dichos factores se incluye el ambiente de citoquinas, el tipo de CPA, la cantidad de antígeno y la afinidad de la interacción epítpe-TCR (Constant y Bottomly, 1997). Algunos estudios

sugieren que bajas dosis de antígeno favorecen una respuesta Th1 y que altas dosis favorecen una respuesta Th2 (Constant y Bottomly, 1997). Es posible que *T. cruzi*, al expresar simultáneamente distintas variantes de proteínas de superficie disminuya la dosis de antígeno para cada epítipo de proteína de superficie, fundamentalmente en los órganos que no son blanco principal de daño, promoviendo una respuesta Th1 específica que permita el control de la infección (Hoft y col, 2000).

Estudios realizados en ratones deficientes en respuestas Th1 o Th2 infectados con *T. cruzi* demostraron que la presencia de citoquinas Th2 contribuye a la persistencia de una mayor carga parasitaria y al aumento de la severidad de la infección en la fase crónica. Por el contrario, los animales deficientes en respuesta Th2 presentan menor número de parásitos e infiltrados inflamatorios (Tarleton y col, 2000). Aunque algunos trabajos sugieren la asociación entre respuesta Th2 y patología, la producción local de citoquinas en animales crónicamente infectados presenta un patrón mixto Th1/Th2 en los órganos blanco de daño (Hontebeyrie-Joskowicz, 1991; Spinella y col, 1990; Zhang y Tarleton 1996 a; 1996 b). Sin embargo, la detección de una respuesta mayoritariamente pro-inflamatoria (IL-6 y TNF α) *in situ* durante la fase crónica sugiere que estas citoquinas son responsables, al menos en parte, de la severa patología observada (Sunnemark y col, 1996). En pacientes con cardiopatía, la producción incrementada de citoquinas pro-inflamatorias ha sido correlacionada con un curso fatal de la infección (Martins Reis y col, 1997).

En la presente Tesis se observó mayor expresión de IL-6 y TNF α en los tejidos blanco de daño para cada cepa. Ya que TNF α es marcador de eventos citolíticos (Beutler y Cerami, 1988) su producción en los tejidos blanco de daño podría estar amplificando y manteniendo las lesiones inflamatorias observadas en los órganos principalmente injuriados. Además, la patología observada mayormente en estos órganos puede estar influenciada también por la producción de IL-6 ya que esta citoquina –conjuntamente con IL-1 β y TNF α – estimula el reclutamiento de leucocitos y está involucrada en el desarrollo de alteraciones endoteliales. Por el contrario, la baja o nula expresión de TNF α e IL-6 en músculo en animales infectados con RA y en nervio en los infectados con CA-I, resultaría en un beneficio para el huésped limitando el daño autoinmune o inflamatorio local y, secundariamente beneficiaría al parásito permitiendo su sobrevida aunque limitando su crecimiento (Millar y col, 1999).

En conjunto, estos resultados demuestran diferencias en la calidad de la respuesta inmune en los órganos blanco y no blanco de daño. Postulamos que en los primeros, la respuesta inmune sería principalmente autorreactiva y patológica mientras que en los segundos, la respuesta inmune estaría reaccionando contra la carga parasitaria local, controlando su multiplicación y diseminación.

CONCLUSIONES

A- Participación de factores humorales en patogenia

1. Sueros de animales infectados con la cepa RA presentan menor reactividad hacia antígenos parasitarios que los sueros de animales infectados con la cepa CA-I.
2. Sueros de animales infectados con ambas cepas de *T. cruzi* presentan reactividades similares contra antígenos conformacionales de nervio y músculo. Esto, conjuntamente con la conclusión 1 indica que la proporción entre activación policlonal inespecífica y reactividad específica anti-parasitaria es mayor en la cepa de mayor virulencia (RA).
3. La inyección epineural de sueros reactivos contra antígenos de nervio altera la conducción nerviosa de manera cepa-dependiente: sueros RA/Ne⁺ inducen aumento del tiempo de latencia y disminución de la amplitud del potencial de acción nervioso (PAN). Por el contrario, sueros de animales infectados con la cepa CA-I no afectan ningún parámetro del PAN.
4. La disminución de la amplitud, que indica un menor número de axones funcionantes, está mediada por IgG ya que su inyección epineural provoca el mismo efecto que la del suero completo.
5. La acción electrofisiológica de los sueros RA/Ne⁺ co-existe con la persistencia de depósitos de IgG marcando el curso axonal y/o vainas de mielina en los nervios en ausencia de parásitos.

Conclusión general

Las alteraciones electrofisiológicas observadas en sistema nervioso periférico en la enfermedad de Chagas crónica están mediadas, al menos en parte, por autoanticuerpos con capacidad de reconocer antígenos conformacionales de sistema nervioso. Las diferencias encontradas entre cepas podrían contribuir a la distinta evolución clínica que presentan individuos infectados.

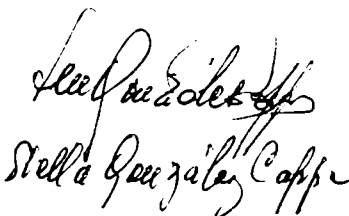
B- Participación de linfocitos T en la producción de daño

1. El uso relativo aumentado y disminuído de los segmentos TCR V β 13 y V β 14, respectivamente, en bazo de animales infectados sugiere que la expresión de este repertorio periférico podría ser marcador de infección.

2. La alta heterogeneidad de secuencias en la región CDR3 de LT TCR V β 13 de bazo, indica que la la sobre-expresión sistémica de este segmento podría estar mediada por una molécula con características similares a un superantígeno.
3. La sobre-expresión del segmento TCR V β 9 marca el órgano blanco de daño para cada cepa de *T. cruzi*: nervio y médula en RA; músculo en CA-I
4. Existe un patrón diferencial de expresión de segmentos TCR V β en el sitio de lesión respecto de la expresión periférica, reforzando la noción que los mecanismos productores de patología deben estudiarse en los órganos lesionados
5. La presencia de una elevada proporción de clones TCR V β 9 con secuencias idénticas en su región CDR3 en nervio y médula de animales infectados con la cepa RA, la ausencia de secuencias homólogas en músculo en animales infectados con CA-I conjuntamente con hallazgos previos que demuestran la reproducción de patología en nervio y médula por transferencia pasiva de LT de animales infectados con la cepa RA, sugiere la presencia de clones autorreactivos en estos tejidos.
6. La existencia de dominancia clonal en LT TCR V β 9 no sobre-expresados en los tejidos que no son blanco principal de daño para cada una de las cepas, conjuntamente con la imposibilidad de reproducir patología por transferencia pasiva de células en los mismos y la presencia local del parásito, sugiere que los clones mayoritarios están dirigidos contra antígenos de *T. cruzi*.
7. Las diferencias encontradas en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF α) en nervio y músculo en animales infectados con una u otra cepa de *T. cruzi*, demuestran diferencias en la calidad de la respuesta inmune en los órganos blanco y no blanco de daño.

Conclusión general

La detección de *T. cruzi* en todos los tejidos analizados y la distinta severidad de la patología observada en los distintos tejidos señalan que la misma no depende exclusivamente de la presencia del parásito pero sí de la calidad del infiltrado inflamatorio local. Postulamos que en los órganos blanco de daño la respuesta inmune es principalmente autorreactiva y patológica mientras que en los órganos no blanco de daño la respuesta inmune estaría dirigida hacia el parásito, controlando su multiplicación/diseminación y limitando el daño autoinmune.


Stella González Caffre


V. Kocel Jernista

Bibliografía

- Acosta AM, Santos Busch CA. 1985. Autimmune miocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation*. 71: 1255- 1261.
- Alba-Soto C, Mirkin G, González Cappa SM. 2001. *T. cruzi*: impairment of antigenic presentation is related to parasite populations. XI Int. Congr. Protozool (ICOP). Salzburg, Austria.
- Acosta-Serrano A, Almeida I, Freitas-Junior LH, Yoshida N, Schenkman S. 2001. The mucin-like glycoprotein super-family of *T. cruzi*: structure and biological roles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114: 143-150.
- Almeida DR Carvalho A, Branco J, Pereira A, Correa L, Vianna P, Buffalo E, Martinez E. 1996. Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. *J. Heart Lung transplant.* 15: 988-992.
- Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M. 1987. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. *Am. J. Path.* 127: 467- 473.
- Arstila PT, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. 1999. A direct estimate of the human alpha beta T cell receptor diversity. *Science*. 286: 958-961.
- Beutler FR, Cerami A. 1988. The biology of cachectin-TNF- α primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 625- 655.
- Bonfa E, Viana VST, Barreto ACP, Yoshinari NH, Cossermelli W. 1993. Autoantibodies in Chagas' disease. An antibody cross-reactive with human and *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *J. Immunol.* 150: 3917- 3923.
- Borda ES, Pascual J, Cossio PM, Vega M, Arana RM, Sterin-Borda L. 1984. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to β adrenoceptor of myocardium and modulates its activity. *Clin. Exp. Immunol.* 57: 679- 686.
- Buggiano V. 1997. Superantigenos e infecciones por retrovirus de tumor mamario murino. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. UBA.
- Campetella O, Sánchez D, Cazzulo JJ, Frasch ACC. 1992. A superfamily of *T. cruzi* surface antigens. *Parasitol. Today.* 8: 378- 381.
- Cardoni RL, Antunez MI, Orn A, Gronvik KO. 1996. T cell receptor V β in the thymus and spleen of mice infected with *T. cruzi*. *Cell. Immunol.* 169: 238- 245.
- Casrouge A, Beaudoin E, Dalle S, Pannetier C, Kanellopoulos J, Kourilsky P. 2000. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol.* 164:5782-7.
- Celentano AM, Gorelik G, Solana ME, Sterin-Borda L, Borda E, González Cappa SM. 1995. PGE₂ involvement in experimental infection with *T. cruzi* subpopulations. *Prostaglandins.* 49: 141- 153.
- Celentano AM. 1996. *Trypanosoma cruzi*. Papel de los macrófagos en la infección experimental del ratón producida por poblaciones parasitarias con diferente capacidad para inducir respuesta inmune. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.
- Cetron MC, Hoff R, Kahn S, Eisen H, Van Voorhis W. 1992. Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural northeastern Brazil endemic for Chagas' disease. *Acta Trop.* 50: 259-266.

- Chagas CJ. 1909. Nova Trypanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. Gen. N. Sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homen. Mem. Inst. Osw. Cruz. 1: 159-218.
- Chagas C. 1916. Processos patogénicos da tripanosomiase americana. Mem. Inst. Osw. Cruz. 8: 5-9.
- Constant SL, Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: The alternative approaches. Annu. Rev. Immunol. 15: 297- 322.
- Cordeiro da Silva A, Santos Lima EC, Vicentelli MH, Minoprio P. 1996. V β 6-bearing T cells are involved in resistance to *T. cruzi* infection in XID mice. Int Immunol. 8: 1213- 1219.
- Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana M. 1974. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin wich reacts with endocardium and vascular structures. Circulation. 49: 13-21.
- Costa RP, Gollob KJ, Fonseca LL, Rocha MOC, Chavez AC, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PR, Colley DG, Correa-Oliveira R, Gazzinelli G, Carvalho-Parra J, Dutra W. 2000. T-cell repertoire analysis in acute and chronic Chagas' disease: differential frequencies of V β 5 expressing T cells. Scand J Immunol. 51: 511- 519.
- Cunha-Neto E, Moliterno R, Coelho V, Guilherme L, Bocchi E, Higuchi MDL, Stolf N, Pileggi F, Steinmann L, Kalil J. 1994. Restricted heterogeneity of T cell receptor variable alpha chain transcripts in hearts of Chagas' disease cardiomyopathy patients. Parasit. Immunol. 16: 171- 179.
- Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingalez B, de Mesias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pileggi F, Kalil J. 1995. Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 3541-3545.
- Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic chagas' cardiomyopathy patient. J. Clin. Invest. 98: 1709-1712.
- Da Silva AC, Espinozza AG, Taibi A, Ouassii A, Minoprio P. 1998. A 24,000 MW *T. cruzi* antigen is a B cell activator. Immunology. 94: 189-196.
- De Faria CR, Melo-Souza S, Rassi A. 1977. Evidencias electromiograficas de denervacao motora em pacientes na fase cronica da doenca de Chagas. Rev. Goiana Med. 23: 125- 130.
- De Oliveira SF, Pedrosa RC, Nascimento JH, Campos de Carvalho AC, Masuda MO. 1997. Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. Circulation. 96: 2031- 2037.
- D'Imperio Lima MR, 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: 201-203.
- D'Imperio Lima M, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. 1986. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. J. Immunol. 137: 353-356.
- DosReis GA. 1997. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosma cruzi* infection. Parasitol Today 13: 335-342.

- Elies R, Ferrari I, Wallukat G, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J, Levin M. 1996. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J. Immunol.* 157: 4203-4211.
- Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G, Elies R, Lobesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J. 1995. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *T. cruzi* and a functional epitope on the human β_1 -adrenergic receptor. *J. Exp. Med.* 182: 59-65.
- Fox CJ, Daska JS. 1997. Molecular analysis of mouse T cell receptor expression using PCR. *Current Protocols in Immunology*. Eds. J Wiley and Sons, Inc. 10.27.5- 10.27.6.
- Frasch ACC. 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *T. cruzi*. *Parasitol Today*. 16: 282- 286.
- Freilij H, muller LA, González Cappa SM. 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 18: 327- 330.
- Freire de Lima CG, Nascimento DO, Soares MBP, Bozza PT, Castro-Faria Neto HC, de Mello FG, DosReis GA, Lopes MF. 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*. 403: 199-203.
- Gao W, Pereira M. 2001. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Burton's tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.* 31: 1503-1512.
- García Erro M, Genovese O, Correale J, Sica REP. 1989. Neuromuscular transmission studies in human chronic Chagas' disease. *Arq. Neuro-Psiquiat.* 47: 279- 282.
- Gea S, Ordonez P, Cerban F, Iosa D, Chizzolini C, Vottero Cima E. 1993. Chagas' disease cardioneuropathy- association of anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-sciatic nerve antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49: 581- 588.
- Goin JC, Perez Leiros C, Borda E, Sterin-Borda L. 1997. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *FASEB J.* 10: 77- 83.
- Gold DP. 1994. TCR V gene usage in autoimmunity. *Curr. Op. Immunol.* 6: 907- 912.
- González Cappa SM, Chiale P, Del Prado GE, Katzin AM, Martini GW, Isola ELD, Abramo Orrego LA, Segura EL. 1980. Aislamiento de una cepa de *T. cruzi* de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica y su caracterización biológica. *Medicina (Buenos Aires)*. 40: 63- 68.
- González Cappa SM; Bijovsky T, Freilij H, Muller LA; Katzin AM. 1981. Aislamiento de una cepa de *T. cruzi* a predominio de formas delgadas en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 41: 119- 120.
- González Cappa SM, Sanz O, Muller L, Molina H, Fernández J, Rimoldi M and Sica R. 1987. Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 41-45.
- González Cappa SM, Mirkin G. 1994. Peripheral nervous system alterations in a murine experimental model of Chagas' disease. En: *Chagas' disease and the nervous system*. Pan American Health Organization. Scientific Publication No. 547. Pag 317- 334.
- Grauert MR, Houdayer M and Hontebeyrie-Joskowicz M. 1993. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactivity antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.* 93: 85- 92.

- Halapi E, Werner A, Wahlstrom J, Osterborg A, Jeddi-Tehrani M, Yi Q, Janson CH, Wigzell H, Grunewald J, Mellstedt H. 1997. T cell repertoire in patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: clonal CD8+ T cell expansions are found preferentially in patients with a low tumor burden. *Eur J Immunol.* 27: 2245-2252.
- Hawke S, Matsuo H, Nicolle M, Malcherek G, Melms A, Willcox N. 1996. Autoimmune T cells in myasthenia gravis: heterogeneity and potential for specific immunotargeting. *Immunol Today.* 17: 307-311.
- Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G, Milon G, Marchal G, Eisen H. 1987. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur. J. Immunol.* 17: 1027-1033.
- Hontebeyrie-Joskowicz M. 1991. Murine *T. cruzi* infection: a role for Th2 cells in the immunopathology of chronic infection. *Res. Immunol.* 142: 141- 143.
- Iosa D. 1994. Chronic Chagasic cardiomyopathy: Pathogenesis and treatment. En: Chagas' disease and the nervous system. Pan American Health Organization. Scientific Publication No. 547. Pag. 99- 148.
- Jazin E, Luquetti AO, Rassi A, Frasch AC, 1991. Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. *Infect Immun.* 59: 2189-91.
- Jenkins RN, McGinnis DE. 1995. T-cell receptor V β utilization in rheumatoid arthritis. En: T- cell receptor use in human autoimmune diseases. Eds. Davis y Buxbaum. *Annals of the New York Academic of Sciences.* Vol 756. 159-172.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 348- 357.
- Kahn S, Van Voorhis W, Eisen H. 1990. The major 85-kD surface antigen of the mammalian form of *T. cruzi* is encoded by a large heterogeneous family of simultaneously expressed genes. *J. Exp. Med.* 172: 589- 597.
- Kahn S, Wleklinski M. 1997. The surface glycoproteins of *T. cruzi* encode a superfamily of variant T cell epitopes. *J. Immunol.* 159: 4444- 4451.
- Katzin AM, Rajmanivich S, González Cappa SM. 1977. Comparative stability of epimastigotes and trypomastigotes with different wash solutions. *J. Parasitol.* 63: 925- 927.
- Kerner N, Ligeard P, Levin MJ, Hontebeyrie-Joskowicz M. 1991. *Trypanosoma cruzi*- antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp. Parasitol.* 73: 451-459.
- Khoury EL, Diez C, Cossio PM, Arana M. 1983. Heterophile nature of EVI antibody in *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 27: 283- 288.
- Khoury EL, Ritacco V, Cossio PM, Laguens RP, Szarfman. 1979. Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.* 36: 8- 15.
- Kierszenbaum F. 1999. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev.* 12: 210-223.
- Kim G, Tanuma N, Kojima T, Kohyama K, Suzuki Y, Kawazoe Y, Matsumoto Y. 1998 a. CDR3 size spectratyping and sequencing of spectratype-derived TCR of spinal cord T cells in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 160: 509- 513.

- Kim G, Kohyama K, Tanuma N, Arimito H, Matsumoto Y. 1998b. Persistent expression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-specific V β 8.2 TCR spectratype in the central nervous system of rats with chronic relapsing EAE. *J Immunol.* 161: 6993- 6998.
- Koberle F. 1968. Chagas' disease and Chagas' syndrome: The pathology of American Trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6: 63-116.
- Kotzin BL, Karuturi S, Chou Y, Lafferty J, Forrester J, Better G, Nedwin G, Offner H, Vandembark A. 1991. Preferential T-cell receptor β chain variable gene use in myelin basic protein-reactive T-cell clones from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 9161- 9165.
- Laguens R, Cabeza Meckert P, Chambó G, Gelpi R. 1981. Chronic Chagas disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. *Medicina.* 41: 40-43.
- Laguens RP, Cabeza Meckert P, Chambo JG. 1988. Antiheart antibody-dependent cytotoxicity in the sera of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 56: 993- 997.
- Laguens RP, Argel MI, Chambo J, Storino R, Cabeza Meckert PM. 1994. Presence of antiheart and antiskeletal muscle glycolipid autoantibodies in the sera of patients with chagasic cardiopathy. *Can. J. Cardiol.* 10: 769- 776.
- Laranja FS, Dias E, Nóbrega G, Miranda A. 1956. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation.* 14: 1035- 1060.
- Lázzari JO. 1994. Autonomic nervous system alterations in Chagas' disease: Review of the literature. En: Chagas' disease and the nervous system. Pan American Health Organization. Scientific Publication No. 547. Pag. 72- 96.
- Leguizamón MS, Campetella OE, González Cappa SM, Frasch ACC. 1994. Mice infected with *T. cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. *Infect Immun.* 62: 3441- 3446.
- Leite de Moraes MC, Coutinho A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Minoprio P, Eisen H, Bandeira A. 1994. Skewed V β TCR repertoire of CD8+ T cells in murine *T. cruzi* infection. *Int Immunol.* 6: 387- 392.
- Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, Chiale PA, Ruiz AM, Kahn A, Rosenbaum MB, Torres HN. 1989. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 530- 538.
- Lindstrom JM, Engel AG, Seybold ME, Lennon VA, Lambert EH. 1976. Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis. II. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis in rat with anti-acetylcholine receptor antibodies. *J. Exp. Med.* 144: 739- 753.
- Lopez Bergami P, Cabeza Meckert P, Kaplan D, Levitus G, Elias F, Quintana F, Van Regenmortel M, Laguens R, Levin M. 1997. Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 β protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 18: 75- 85.
- Losavio A, Jones M, Sanz O, Mirkin G, González Cappa S, Muchnik S and Sica R. 1989. A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 539-547.
- Losavio AS, Sica REP, Sanz OP, Mirkin GA, González Cappa SM, Muchnik S. 1993. Functional changes of the sciatic nerve in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires):* 53: 129-132.

- Low HP, Santos MAM, Wize B, Tarleton R. 1998. Amastigote surface proteins of *T. cruzi* are targets for CD8+ CTL. *J. Immunol.* 160: 1817- 1823.
- Maini MK, Casorati G, Dellabona P, Wack A, Beverley PC. 1999. T-cell clonality in immune responses. *Immunol Today.* 20: 262- 266.
- Marín O, Volverg V, González Cappa SM. 1993. Importancia de la vía de inoculación de cepas de *T. cruzi* habitualmente letales como determinante de cronicidad en ratones. *Medicina (Buenos Aires).* 53: 62.
- Marrack P, Winslow G, Choi Y, Scherer M, Pullen A, White J, Kappler J. 1993. The bacterial and mouse mammary tumor virus superantigens; two different families of proteins with the same functions. *Immunol. Rev.* 131: 79-92.
- Martins Reis M, Higuchi ML, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Belloti G, Pileggi F. 1997. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *T. cruzi* antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83: 165- 172.
- Mason D. 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today.* 19: 395- 404.
- Masuda MO, Levin M, Farias de Oliveira S, dos Santos Costa PC, Lopez Bergami P, dos Santos Almeida N, Coury Pedrosa R, Ferrari I, Hoebbeke J, Campos de Carvalho AC. 1998. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J.* 12: 1551- 1558.
- Matsumoto Y, Jee Y, Sugisaki M. 2000. Successful TCR-based immunotherapy for autoimmune myocarditis with DNA vaccines after rapid identification of pathogenic TCR. *J Immunol.* 164: 2248- 2254.
- McCormick TS, Rowland EC. 1989. *Trypanosoma cruzi*: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. *Exp. Parasitol.* 69: 393-401.
- McCormick TS, Rowland EC. 1993. *Trypanosoma cruzi*: recognition of a 43-kDa muscle glycoprotein by autoantibodies present during murine infection. *Exp. Parasitol.* 77: 273- 281.
- Melo RC, Brener Z. 1980. Tissue tropism of different *T. cruzi* strains. *J. Parasitol.* 64: 475- 482.
- Millar AE, Wleklinski L, Kahn SJ. 1999. The surface protein superfamily of *T. cruzi* stimulates a polarized Th1 response that becomes anergic. *J. Immunol.* 162: 6092- 6099.
- Millar A, Kahn S. 2000. The SA85-1.1 protein of the *T. cruzi* trans-sialidase superfamily is a dominant T-cell antigen. *Infect. Immun.* 68: 3574-3580.
- Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M and Coutinho A. 1986a. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B- cell responses. *Scand. J. Immunol.* 24: 661-668.
- Minoprio PM, Coutinho A, Joskowicz M, D'Imperio Lima MR, and Eisen H. 1986b. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand.J.Immunol.* 24: 669-679.
- Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A. 1988. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack of parasite specificity. *Scand J Immunol* 28:553-561.

- Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. 1989a. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of the TCRI T cells. *Immunol. Rev.* 112: 183-207.
- Minoprio P, Andrade L, Lembezart MP, Ozaki L, Coutinho A. 1989b. Indiscriminate representation of VH-gene families in the murine T lymphocyte responses to *T. cruzi*. *J. Immunol.* 11: 4017-4021.
- Minoprio P, el Cheikh MC, Murphy E Hontebeyrie-Joskowicz M, Coffman R, Coutinho A, O'Garra A. 1993. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN gamma dependent. *J. Immunol.* 151: 4200-4208.
- Minoprio P. 2001. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int. J Parasitol.* 31: 588- 591.
- Mirkin GA, Jones M, Sanz OP, Rey R, Sica REP, González Cappa SM. 1994. Experimental Chagas' disease: electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 73: 69-79.
- Mirkin GA, Celentano AM, Malchiodi EL, Jones M, González Cappa SM. 1997. Different *Trypanosoma cruzi* strains promet neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 107: 328- 334.
- Mirkin G, González Cappa SM. 2000. Ciclo celular de dos poblaciones de *T. cruzi* con diferente virulencia y tropismo. *Medicina.* 60: 748.
- Molina HA, Cardoni RL, Rimoldi MT. 1987. The neuromuscular pathology of experimental Chagas' disease. *J. Neurol. Sci.* 81: 287- 300.
- Moncayo A. 1997. Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *Wld. Statist. Quart.* 50: 195- 198.
- Mosca W, Plaja J. 1981. Delayed hypersensitivity to heart antigens in Chagas' disease as measured by *in vitro* lymphocyte stimulation. *J. Clin. Microbiol.* 14: 1- 5.
- Moser D, Kirchhoff LV, Donelson JE. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polimerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1477- 1482.
- Müller LA, González Cappa SM. 1985. *Trypanosoma cruzi*: diferencias en el requerimiento de protectores proteicos presentados por 2 cepas argentinas. *Rev. Arg. Microbiol.* 17: 59- 60.
- Muller LA, González Cappa SM. 1987. Immunogenicity of *T. cruzi* strains determined by neutralization test. *Rev. Arg. Microbiol.* 19: 101- 108.
- Murta SMF, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.* 93: 203- 214.
- Nitta T, Bell R, Okumura K, Sato K, Steinman L. 1991. T- cell receptor V β gene expression differs in Tumor-infiltrating lymphocytes within primary and metastatic melanoma. *Cancer Research.* 51: 5565- 5569.
- Paliard X, West SG Lafferty JA, Clements JR, Kappler JW, Marrak P, Kotzin BL. 1991. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science.* 253: 325-329.

- Pannetier C, Cochet M, Darche S, Casrouge A, Zoller M, Kourilsky P. 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4319-4323.
- Panzara MA, Gussoni E, Steinman L, Oksenberg JR. 1992. Analysis of the T cell repertoire using the PCR and specific oligonucleotide primers. *Biotechniques.* 12: 728- 735.
- Peoples GE, Davey MP, Goedegebuure PS, Schoof DD, Eberlein TJ. 1993. T cell receptor V β 2 and V β 6 mediate tumor-specific cytotoxicity by tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Immunol.* 151: 5472- 5480.
- Pereira ME, Zhang K, Gong Y, Herrera EM, Ming M. 1996. Invasive phenotype of *T. cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. *Infect Immun.* 64: 3884-3892.
- Petry K, Voison P, Baltz T. 1987. Complex lipids as common antigens to *Trypanosoma cruzi*, *T. dionosii*, *T. vespertilionis* and nervous tissue (astrocytes, neurons). *Acta Trop.* 44: 381- 386.
- Postan M, McDaniel JP, Dvorak JA. 1984. Studies of *T. cruzi* clones in inbred mice. II. Course of infection of C57BL/6 mice with single-cell-isolated stocks. *Am J Trop Med Hyg.* 33: 236- 238.
- Postan M, Bailey JJ, Dvorak JA, McDaniel JP, Pottala EW. 1987. Studies of *T. cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *Am J Trop Med Hyg.* 37: 541- 549.
- Rassi A, Rassi Junior A, Rassi GG. 2000. Patología. En: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Editado por Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2da edición. Pag. 231-245.
- Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-da Silva A, Arala-Chaves M, Coutinho A, Minoprio P. 2000. A B cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a proline racemase. *Nat. Med.* 6: 890-897.
- Ribeiro AL, Moraes RS, Ribeiro JP, Ferlin EL, Torres RM, Oliveira E, Rocha MO. 2001. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas' disease. *Am Heart J.* 141: 260-265.
- Ribeiro dos Santos R, Marquez JO, Von Gal Furtado CC, Ramos de Oliveira JC, Martins AR, Koberle F. 1979. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed. Parasit.* 30: 19- 23.
- Ribeiro dos Santos R, Hudson L. 1980. *Trypanosoma cruzi*: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasite Immunol.* 2: 1-10.
- Ribeiro dos Santos R, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. 1992. Anti- CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn mice hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 175: 29-39.
- Ribeiro dos Santos R, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 57: 2640- 2644.
- Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira ARL. 1989. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 57: 2640-2644.
- Rocha A, Oliveira de Meneses AC, Moreira da Silva A, Ferreira MS, Nishioka SA, Burgarelli MK, Almeida E, Turkato Jr G, Metzke K, Reis Lopes E. 1994. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 261- 268.

- Rose NR, Bona C. 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today*. 14: 426- 430.
- Rosenberg S, Chavez CJ, Higuchi ML, Lopes MBS, Castro LHM, Machado LR. 1992. Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. *Neurology*. 42: 640- 642.
- Said G, Joskowicz M, Antunes Barreira A, Eisen H. 1985. Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. *Ann. Neurol*. 18: 676- 683.
- Sanz OP, Cardoni RL, Celentano AM, Rimoldi MT, Sica REP, González Cappa SM. 1991. *Trypanosoma cruzi*: inducción de alteraciones del sistema nervioso periférico en diferentes cepas de ratones. *Rev. Arg. Microbiol*. 23: 30-34.
- Schmunis GA. 1994. American Trypanosomiasis as a public health problem. En: Chagas' disease and the nervous system. Pan American Health Organization. Scientific Publication No. 547. Pag. 3-29.
- Sensi M, Parmiani G. 1995. Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses. *Immunol. Today*. 16: 588- 595.
- Sica REP, Sanz OP, Aristimuno G, Basso S, Pagano MA, Taratuto A, Fumo T, Ratusnu A, Colombi A. 1979. Muscle denervation in chronic Chagas' disease. *Medicina*. 39: 579- 588.
- Sica REP, Filipini D, Panizza M, Fumo T, Basso S, Lazzari J, Molina H. 1986. Involvement of the peripheral sensory nervous system in human Chagas' disease. *Medicina*. 46: 662- 668.
- Sica REP, Genovese O, García Erro M. 1991. Peripheral nerve motor conduction studies in patients with chronic Chagas' disease. *Arq. Neuropsiquiat*. 49: 405- 408.
- Sica REP. 1994. Compromiso del sistema nervioso. En: Enfermedad de Chagas. Editores: Storino RA, Milei J. Doyma Argentina. Buenos Aires. Pag. 303-320.
- Sica REP, González Cappa SM, Sanz OP, Mirkin GA. 1995. Peripheral nervous system involvement in human and experimental chronic american trypanosomiasis. *Bull. Soc. Path. Ex*. 88: 156-163.
- Snary D, Flint J, Wood J, Scott M, Chapman M, Dodd J, Jessell T, Miles M. 1983. A monoclonal antibody with specificity for *T. cruzi* central and peripheral neurones and glia. *Clin. Exp. Immunol*. 54: 617- 624.
- Sottini A, Imberti L, Gorla R, Cattaneo R, Primi D. 1991. Restricted expression of T-cell receptor V β but not V α genes in reumatoid arthritis. *Eur J immunol*. 21: 461-466.
- Spinella S, Milon G, Hontebeyrie-Joskowicz M. 1990. A CD4+ TH2 cell line isolated from mice chronically infected with *T. cruzi* induces IgG2 polyclonal response *in vivo*. *Eur. J. Immunol*. 20: 1045-1051.
- Spinella S, Liegeard P, Hontebeyrie-Joskowicz M. 1992. *T. cruzi*: Predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. *Exp. Parasitol*. 74: 46-56.
- Sterin-Borda L, Cossio PM, Gimeno MF, Gimeno AL, Diez C, Laguens RP, Cabeza Meckert P, Arana RM. 1976. Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and functional aspects. *Cardiovasc. Res*. 10: 613- 622.
- Sterin-Borda L, Gorelik G, Borda ES. 1991. Chagasic IgG binding with cardiac muscarinic cholinergic receptors modifies cholinergic-mediated cellular transmembrane signals. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 61: 387- 397.

- Sunnemark D, Ulfgrén AK, Orn A, Harris RA. 1996. Cytokine production in hearts of *T. cruzi*-infected CBA mice: do cytokine patterns in chronic stage reflect the establishment of myocardial pathology? *Scand J Immunol.* 44: 421-429.
- Sunnemark D, Andersson R, Harris R, Jeddi-Tehrani M, Orn A. 1998. Enhanced prevalence of T cells expressing TCRBV8S3 in hearts of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Immunol. Letters.* 60: 171- 177.
- Taratuto A, Pagano M, Fumo T, Sanz OP, Sica REP. 1978. Histological and histochemical changes of the skeletal muscle in human chronic Chagas' disease. *Arq. Neuro-Psiquiat.* 36: 327- 329.
- Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. 1994. Depletion of T cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun.* 62: 1820- 1829.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. 1996. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int. Immunol.* 8: 13-22.
- Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. 1997. "Autoimmune rejection" of neonatal hearts transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 3932- 3937.
- Tarleton RL, Zhang L. 1999. Chagas' disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol. Today.* 15: 94-99.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Zhang L. 2000. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 165: 1520-1525.
- Tarleton RL. 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31: 549-553.
- Tatum A. 1993. Experimental paraprotein neuropathy, demyelination by passive transfer of human IgM anti-myelin-associated glycoprotein. *Ann Neurol.* 33: 502-506.
- Teixeira AR, Teixeira G, Macedo V, Prata A. 1978. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T lymphocyte mediated ⁵¹Cr release from human heart cells in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 1097- 1107.
- Tekiel V, Mirkin GA, González Cappa SM. 1997. Chagas' disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 115: 495- 502.
- Tibbetts RS, McCormick TS, Rowland EC, Miller SD, Engman DM. 1994. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J. Immunol.* 152: 1493- 1499.
- Todd CW, Todd NR, Guimaraes AC. 1983. Do lymphocytes from chagasic patients respond to heart antigens? *Infect. Immun.* 40: 832- 835.
- Tomonari K, Fairchild S, Rosenwasser O. 1993. Influence of viral superantigens on Vβ- and Vα- specific positive and negative selection. *Immunological Reviews.* 131: 131-168.
- Toyka KV, Drachman DB, Pestronk A, Kao I. 1975. Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science.* 190: 397-399.
- Trischmann TM, Bloom BR. 1982. Genetics of murine resistance to *T. cruzi*. *Infect Immun.* 35: 546- 551.

- Trischmann TM, Tanowitz H, Winter M, Bloom BR. 1978. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp Parasitol.* 45: 160- 168.
- Tyler KM, Engman DM. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 31: 472-481.
- Urban JL, Kumar V, Kono D, Gomez C, Horvath S, Clayton J, Ando D, Sercarz E, Hood L. 1988. Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. *Cell.* 54: 577-592.
- Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Correa-Oliveira R. 1996. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet.* 348: 891- 892.
- Van Voorhis W, Eisen H. 1989. Fl-160: A surface antigen of *T.cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169: 641-652.
- Van Voorhis W, Schlekewy L and Trong HL. 1991. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the Fl-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 88: 5993-5997.
- Vandenbark A, Chou Y, Whitham R, Mass M, Buenafe A, Liefeld D, Kavanagh D, Cooper S, Hashim G, Offner H and Bourdette D. 1996. Treatment of multiple sclerosis with T-cell receptor peptides: results of a double-blind pilot trial. *Nat Med.* 2: 1109-1115.
- Vianna G. 1911. Contribucao para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 3: 276- 300.
- Weidmann E, Whiteside TL, Giorda L, Herberman RB, Trucco M. 1992. T-cell receptor V β gene usage in tumor infiltrating lymphocytes and blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 52: 5913- 5920.
- Wood JN, Hudson L, Jessell TM, Yamamoto M. 1982. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *T.cruzi* parasites. *Nature.* 296: 234- 238.
- Wucherpfennig KW, Ota K, Endo N, Seidman JG, Rosenzweig A, Weiner HL, Hafler DA. 1990. Shared human T cell receptor V beta usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science.* 248: 1016- 1019.
- Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li M, Keddy C, Cuznar ML, Hafler DA. 1992. T cell receptor V α -V β repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J Exp Med.* 175: 993-1002.
- Zhang L, Tarleton RL. 1996a. Characterization of cytokine production in murine *T. cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur. J. Immunol.* 26: 102- 109.
- Zhang L, Tarleton RL 1996b. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *T. cruzi* infections. *Exp. Parasitol.* 84: 203- 213.
- Zhang L, Tarleton RL. 1999. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 180: 480-486.
- Zwimer N, Malchiodi EL, Chiamonte MG, Fossati CA. 1994. A lytic monoclonal antibody to *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes which recognized an epitope expressed in tissues affected in Chagas' disease. *Infect. Immun.* 62: 2483- 2489.