

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

Trypanosoma cruzi: Protección contra la infección
experimental en ratones por medio de
inmunización con BCG.

188

EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELAZQUEZ

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 7 5



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS Tesis
AÑO 1975
FECHA _____
PROC 117-18
S _____



QUINCE

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: PROFESOR MAGDALENA ACOSTA SEGURA

VOCAL: " GUADALUPE VELEZ PRATT

SECRETARIO: " LIBRADO ORTIZ ORTIZ

1er. SUPLENTE: " PAULA COPPOLA DE RIVAS

2o. SUPLENTE: " ERNESTINA BALLESTEROS RUEDA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE INMUNOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA --
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

SUSTENTANTE: EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELAZQUEZ

ASESOR DEL TEMA: DR. LIBRADO ORTIZ ORTIZ

El presente trabajo se efectuó bajo la dirección
del Dr. Librado Ortiz - Ortiz
en el departamento de Ecología Humana
de la Facultad de Medicina
de la U.N.A.M.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Dr. Librado Ortiz - Ortiz su valiosa -
dirección en el desarrollo del presente trabajo. Al Dr. Amado -
González Mendoza, a la M. en C. B. Magdalena Fresán Contreu
ras y a los compañeros del laboratorio su colaboración en la realiz
zación de esta tesis. Al personal del Departamento de Ecología -
Humana las atenciones recibidas.

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS ABUELITAS

A MIS MAESTROS

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
ASPECTOS CELULARES DE LA RESPUESTA INMUNE	5
Inmunidad mediada por células en infecciones pro_ ducidas por bacterias y protozoarios intracelulares.	9
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	18
DISCUSION	25
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFIA	30

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), padecimiento prácticamente incurable causado por el protozoario flagelado Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi afecta a varios millones de personas residentes en ciertas regiones de América Central, Sudamérica y México, constituyendo uno de los problemas de salud pública más importantes de esas zonas (1, 18, 74)

La tripanosomiasis americana puede manifestarse como una infección aguda, generalizada y febril durante la cual se produce destrucción tisular asociada con la multiplicación intracelular del parásito; o más a menudo como un proceso crónico que provoca miocardiopatías severas y menos comúnmente lesiones intestinales y esofágicas de patogénesis obscura. (1, 22)

Existen evidencias circunstanciales que sugieren fuertemente que muchos de los aspectos de la enfermedad de Chagas tienen un componente inmunológico. Así, la presencia regular de infiltrados de células mononucleares en el corazón de animales o pacientes con cardiopatía chagásica sugiere la participación de mecanismos inmunológicos, especialmente de autoinmunidad e hipersensibilidad retardada, en la patogénesis de ésta (68, 70, 74) . Por otra parte, mediante el empleo

de tratamientos inmunosupresores, se ha demostrado que la resistencia del huésped a la tripanosomiasis es producto de la respuesta inmune (2, 5, 18, 54, 57, 72, 74). A pesar de ello, nuestro conocimiento de la naturaleza precisa de los mecanismos inmunológicos implicados en la defensa contra la infección por T. cruzi es muy limitado.

La importancia de los anticuerpos humorales en la protección es una cuestión que permanece incierta. Se han realizado estudios de transferencia pasiva en los que ha sido difícil probar consistentemente que la resistencia depende de la presencia de anticuerpos humorales (18, 29, 74). Por otra parte, los experimentos efectuados in vitro para tratar de establecer si los tripomastigotes o formas virulentas de T. cruzi son susceptibles de lisis mediada por anticuerpos humorales, han producido resultados contradictorios. De tal forma que, mientras unos han demostrado ineficacia de los sueros ensayados (38, 67) otros han presentado evidencias de que las formas sanguíneas del parásito pueden sufrir lisis inmune (6)

Por lo anteriormente descrito y por el hecho de que en la sangre de pacientes chagásicos y de animales experimentalmente infectados se encuentran tripomastigotes aún cuando posean anticuerpos circulantes (7, 18, 29), se ha enfatizado la posibilidad de que los mecanismos de defensa sean esencialmente de tipo celular y que los anticuerpos y el complemento pueden contribuir a través de sus propiedades opsónicas (18, 29)

Por otro lado, actualmente se está reconociendo cada vez con mayor claridad la importancia de la inmunidad mediada por células (IMC) en la protección contra muchas infecciones causadas por bacterias y protozoarios intracelulares (26, 30, 34, 41). En el caso particular de la enfermedad de Chagas, se ha demostrado la existencia de IMC en pacientes y en animales de experimentación usando pruebas in vitro (28, 58, 60, 68, 70-71, 75) e in vivo (20, 55, 68, 70). Los estudios experimentales realizados en ratas y ratones neonatalmente timectomizados (2, 54, 57), así como en ratones tratados con suero antilinfocítico (54, 72) los cuales tienen abatidas las respuestas de IMC como consecuencia de los tratamientos aplicados, sugieren la participación de dicha inmunidad en la protección, ya que el número de tripomastigotes en sangre y de amastigotes en los tejidos se eleva en forma muy importante en estos animales. Además el porcentaje de mortalidad entre ellos es comparativamente mayor que el de los animales normales infectados con el parásito. Sin embargo, los resultados de estos trabajos, no nos permiten definir hasta que grado la resistencia adquirida depende de la IMC, o si ésta juega un papel sobresaliente en ella; debido a que existen subpoblaciones de linfocitos derivados del timo que intervienen como células "cooperadoras" en las respuestas humorales (9, 11, 13, 15, 36, 47) y es posible que los métodos empleados para afectar las respuestas de IMC pudieran ejercer también alguna acción sobre la producción de anticuerpos.

Tomando en consideración que, en el caso de la enfermedad de Chagas no se conocen los mecanismos inmunológicos que participan en el establecimiento de la resistencia del huésped contra el parásito y postulando que éstos pudiesen ser de IMC, decidimos explorar la posibilidad de proteger ratones contra la infección producida por T. cruzi mediante la administración de BCG; ya que se ha demostrado que este tratamiento induce en otros sistemas (4, 21, 33, 51) una inmunoestimulación no específica de las respuestas de IMC.

ASPECTOS CELULARES DE LA RESPUESTA INMUNE

Desde los trabajos de transferencia pasiva de la hipersensibilidad por contacto y de la hipersensibilidad retardada a tuberculina realizados por Landsteiner y Chase (8, 24), conocemos que existen estados inmunes mediados por factores diferentes a los anticuerpos humorales y que sólo pueden ser transferidos pasivamente a receptores normales por medio de células linfoides obtenidas de animales previamente sensibilizados.

Además, el descubrimiento de la existencia de dos poblaciones diferentes de células linfoides: linfocitos derivados de la Bursa de Fabricius en aves o su equivalente en mamíferos (linfocitos B) y linfocitos derivados del timo (linfocitos T), así como la disponibilidad de reactivos específicos para distinguir entre estos dos tipos celulares, han permitido establecer que los linfocitos T son necesarios en la transferencia de la inmunidad comúnmente conocida como inmunidad mediada por células (IMC). Por otra parte, se ha demostrado que los linfocitos B son los precursores de las células que sintetizan y secretan anticuerpos en la respuesta inmune humoral.

Los estudios de la IMC en animales intactos tienen limitaciones inherentes; particularmente es difícil determinar con exactitud el tipo celular involucrado en todas y cada una de sus diferentes manifestaciones. Además, es poco factible analizar in vivo

los mecanismos moleculares mediante los cuales estas células participan en la inducción o en la expresión de estas respuestas.

Estos problemas han sido resueltos cuando menos en parte, gracias al desarrollo de modelos in vitro que pueden ser correlacionados con los fenómenos observados in vivo y que hacen posible la investigación de los mecanismos de la IMC.

A través de los estudios realizados in vitro sobre la IMC se ha llegado al conocimiento de que los linfocitos estimulados por antígenos específicos o por mitógenos, son capaces de sintetizar y liberar en el medio de cultivo varios factores con actividad biológica, los cuales pueden ser detectados por medio de diferentes sistemas. Esta gran variedad de sustancias a las que se denomina "productos de linfocitos activados" (PLAs). "mediadores" o "linfocinas" ejercen su acción sobre distintos tipos celulares, entre los que cuentan células fagocíticas mononucleares o macrófagos (CFM) y otros linfocitos. Es muy posible que varias de las actividades evaluadas in vitro sean mediadas por una misma entidad molecular.

Uno de los PLAs más estudiados ha sido el MIF y aunque este factor se ha definido como una sustancia que inhibe la migración de los macrófagos es probable que su efecto primario sea la modificación del metabolismo de los monocitos y macrófagos ya que al incubar CFM normales con fracciones ricas en MIF se producen en

ellas una serie de cambios morfológicos, metabólicos y funcionales (40). Algunos autores disocian ambos fenómenos dándole el nombre de MAF (factor activador de macrófagos) a la sustancia que teóricamente produce este efecto (37, 73).

Por otra parte, a pesar de que los linfocitos B son las células directamente responsables de la síntesis de anticuerpos, se ha probado la existencia de procesos de cooperación celular entre los linfocitos T y B en la inducción in vitro e in vivo de respuestas humorales a una gran variedad de antígenos entre los que se incluyen eritrocitos de carnero (GRC) y conjugados proteína-hapteno.

Esta colaboración celular se ha demostrado en diversos sistemas experimentales. En uno de ellos (9) se mostró que ratones irradiados y reconstituídos con timocitos y células de médula ósea (linfocitos B) producen una respuesta humoral primaria a GRC significativamente mayor que la de los animales irradiados a los que se les han transferido células de timo o de médula ósea por separado. En otros trabajos (36) se probó que la respuesta humoral a GRC en ratones neonatalmente timectomizados (los cuales responden pobremente a la estimulación antigénica) puede ser restaurada mediante la transferencia de timocitos semialogénicos o de linfocitos del conducto torácico. Tratando las células productoras de anticuerpos obtenidas del bazo de estos animales, con sueros anti-antígenos de histo-

compatibilidad (anti H-2) y complemento se demostró que ellas (linfocitos B) provenían del receptor. Estos hallazgos se confirmaron usando para la transferencia, células con marcadores cromosómicos específicos, determinándose que aunque los linfocitos T son necesarios para la respuesta, no son los precursores de las células formadoras de anticuerpos (47)

Aunque todavía no conocemos el mecanismo exacto de los procesos de colaboración entre los linfocitos T y B, sabemos que la interacción T-B es un proceso metabólicamente activo, mediado por dos tipos de factores subcelulares liberados cuando las células T son estimuladas por el antígeno y a pesar de que son diferentes en su constitución y en su modo de acción, ambas causan el mismo efecto sobre la producción de anticuerpos. Según Feldmann y Basten (15) uno de los componentes es un complejo de Ig derivada de T combinada con el antígeno, que tiene un elevado peso molecular, que es específico y que es altamente citofílico para macrófagos; mientras que el otro es de bajo peso molecular, inespecífico y que además es producido en grandes cantidades por las células T estimuladas con antígenos de histocompatibilidad.

Inmunidad mediada por células en infecciones producidas
por bacterias y protozoarios intracelulares

La IMC y la inmunidad humoral participan en la protección contra infecciones producidas por diversos organismos, aunque los dos tipos básicos de respuesta varían en importancia en diferentes situaciones particulares. Además, ambas formas de la respuesta inmune pueden contribuir a la patogénesis del padecimiento infeccioso.

La IMC juega un papel de gran importancia en la resistencia a muchas infecciones causadas por bacterias y protozoarios intracelulares (26, 30, 34, 41). Su participación se ha demostrado en experimentos de transferencia pasiva, en los cuales se ha encontrado que al tratar las células que van a ser transferidas con sueros que contienen anticuerpos contra el determinante antigénico de los linfocitos T (antígeno θ) y complemento se suprime el efecto protector normalmente inducido por éstas (25, 44).

Por otra parte, se ha demostrado también, el requerimiento de CFM en la expresión de la IMC, ya que el éxito de la protección inducida por la transferencia pasiva, depende de la integridad del sistema fagocítico mononuclear en el receptor. De tal forma que, el efecto protector de la transferencia celular es abolido

si al receptor se le ha aplicado algún tratamiento (irradiación, - - ciclofosfamida, vinblastina) que interfiera con la generación de los - - precursores de los macrófagos (monocitos) (35, 43, 69).

Además, la división mitótica de las CFM inmediata - - mente precede a la aparición de actividad antimicrobiana efectiva, lo - - cual sugiere que la proliferación de los macrófagos es un paso impor - - tante en el desarrollo de la respuesta protectora (42). Por lo tanto, la expresión de la IMC estará dada tanto por los linfocitos como por - - los macrófagos.

La participación de los macrófagos activados en la - - protección contra microorganismos patógenos intracelulares es indu - - dable. La "activación" de los macrófagos parece ser un fenómeno inmunológico dependiente de los linfocitos T (25, 41, 44-46), a consecuencia de la interacción de éstos con el antígeno específico o - - con mitógenos. Esta interacción ocasiona la liberación de "linfocinas" (16, 19, 23, 34, 37, 50, 73), las cuales estimulan a los macrófagos, ocasionando un aumento considerable tanto en la velocidad de la fago - - citosis como en la digestión intracelular, permitiéndoles así, des - - truir más eficientemente a los gérmenes patógenos. Este fenómeno ha sido demostrado in vivo e in vitro. Por ejemplo, si se infectan - - ratones deficientes en linfocitos T con Mycobacterium tuberculosis se observa que los animales son incapaces de destruir a la bacteria, sin

embargo, si se les reconstituye con timocitos singénicos aparece nuevamente la actividad microbicida (45). Este efecto se debe a que los ratones deficientes en linfocitos T tienen reducida la capacidad de movilizar y "activar" a los macrófagos (46).

Estudios in vitro realizados por Patterson y Youmans (50) muestran que macrófagos normales cultivados con sobrenadantes obtenidos de linfocitos de animales sensibilizados con Mycobacterium tuberculosis H37Ra los cuales se han cultivado en presencia de M. tuberculosis H37Rv, adquieren la capacidad de inhibir el crecimiento intracelular de la cepa H37Rv, probablemente debido a la acción de algún "mediador" presente en el sobrenadante.

Una de las características más notables de los macrófagos "activados" es la falta de especificidad en la expresión de sus actividades microbicidas (3, 23, 26, 30-31, 41, 56). De tal forma, que el efecto antimicrobiano de éstos puede ejercerse no solamente contra el organismo infectante original, sino también contra organismos patógenos intracelulares no relacionados antigénicamente (3, 41), incluyendo microorganismos de grupos filogenéticos distintos (17, 23, 41, 49, 53, 56). Este fenómeno de resistencia inespecífica (26) se ha observado claramente en estudios in vivo, en los cuales se encontró que los ratones infectados con Brucella abortus (30) o BCG (3) fueron altamente resistentes a la infección con Listeria

monocytogenes, y que la infección de ratones con Mycobacterium tuberculosis H37 Ra produjo resistencia aumentada contra Listeria y Klebsiella (12) .

Por otra parte, los animales infectados crónicamente con los protozoarios Toxoplasma gondii o Besnoitia jellisoni adquieren un estado de resistencia contra Listeria, Salmonella y a otros protozoarios (56), así como contra Mengo virus (53), y algunos hongos (Cryptococcus neoformans) (17) .

La inespecificidad en la expresión de la capacidad microbicida de los macrófagos "activados" ha sido confirmada en experimentos realizados in vitro . Simon y Sheagren (62) obtuvieron células de exudado peritoneal de animales sensibilizados a M. tuberculosis o a globulina gamma bovina y las cultivaron in vitro con o sin el antígeno correspondiente. Después de retirar del cultivo los linfocitos y el antígeno, las monocapas de células adherentes (macrófagos) se infectaron con un microorganismo no relacionado antigénicamente (L. monocytogenes), demostrándose que los macrófagos de animales inmunes manifestaron una actividad bactericida aumentada cuando el exudado peritoneal había sido incubado con el antígeno específico antes de la infección. Estos datos se correlacionaron con la prueba de migración de los macrófagos, la cual se inhibió cuando se usaron condiciones similares. En otros experimentos (27, 63) se probó que los macrófagos normales pueden ser

activados cuando se cultivan en presencia de linfocitos sensibilizados y el antígeno específico. Krahenbul y Remington (23) demostraron que cuando las células del bazo de cobayos crónicamente infectados con T. gondii eran cultivadas in vitro con antígeno soluble del parásito, conferían a los macrófagos normales presentes en el cultivo un estado de resistencia a Listeria monocytogenes, manifestándose ésta por la rápida destrucción intracelular de la bacteria. En los sobrenadantes de los cultivos se detectó MIF y cuando éstos se agregaron a macrófagos normales indujeron también un aumento en la capacidad bactericida de los mismos.

En estudios realizados por Fowles y col. (16) se probó que las fracciones ricas en MIF procedentes de sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con concanavalina A aumentaban la actividad bacteriostática de macrófagos normales. No obstante se observó una actividad antibacteriana más marcada cuando los macrófagos normales se incubaron directamente con linfocitos obtenidos de animales sensibilizados y el antígeno específico. Es posible que los linfocitos puedan producir componentes activos más lábiles que el MIF o que la interacción directa entre linfocitos y macrófagos sea necesaria para que éstos adquieran una actividad antimicrobiana más efectiva.

MATERIAL Y METODOS

Ratones. - En todos los experimentos se usaron ratones hembras de la cepa CF-1 (Carworth Farm) con peso de 17-20 gramos. Los animales fueron colocados en cajas de plástico y se alimentaron con tabletas de Purina (Purina de México, S.A.) y agua ad libitum.

Trypanosoma cruzi. - Se utilizó una cepa mio-reticulotrópica proporcionada por el Dr. F. Navarrete del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. Esta cepa ha sido mantenida durante dos años con virulencia estabilizada por pases sucesivos en ratón en el laboratorio de Inmunología del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina, UNAM.

BCG (Bacillus Calmette-Guérin) . - Se usó la vacuna liofilizada preparada por el Instituto Nacional de Higiene de la S.S.A., México, D.F. Esta fué reconstituída con solución estéril de NaCl 0.15 M (SSI), ajustándose su concentración a 16×10^6 bacilos viables/ml.

Determinación de la LD₅₀ de T. cruzi. - Para determinar la dosis de tripomastigotes necesaria para matar el 50% de un grupo de ratones en un tiempo de 30 días (LD₅₀/30 días) se inocularon 4 grupos de ratones por vía intraperitoneal con diferentes dosis de tripomastigotes.

mastigotes, es decir 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 y 2×10^5 . Se determinó el tiempo de muerte de los ratones de los diferentes grupos y se calculó la LD_{50} por el método de Reed y Muench (52), la cual resultó ser de 387 tripomastigotes/animal (10).

Cuenta de parásitos en sangre. - Los niveles de parasitemia se determinaron cada 5 días sangrando de la cola los ratones infectados con T. cruzi. La técnica consiste en desinfectar la cola con alcohol al 70%, se deja secar y posteriormente se practica un corte con tijeras en la punta de la misma. Se obtiene una pequeña gota de sangre, la cual se diluye 1:20 ó 1:100 con SSI heparinizada (10 U.I. heparina/ml) utilizando para ello pipetas de Thoma. Con la suspensión así preparada se llenan cámaras de Neubauer y se determina el número de tripomastigotes/ mm^3 .

Inmunización. - Los ratones se dividieron en dos grupos y se trataron de la siguiente forma:

- i) Un grupo recibió 2 aplicaciones de BCG (4×10^6 bacilos viables en 0.25 ml cada una) por vía intravenosa con un intervalo de 10 días entre ellas.
- ii) Otro grupo (control) recibió únicamente SSI (0.25 ml) por vía intravenosa en las mismas fechas en que el primero fué inoculado con BCG.

iii) Un día después de la segunda aplicación de BCG o de SSI todos los ratones se infectaron por vía intraperitoneal (día cero) con 2×10^4 tripomastigotes de T. cruzi.

Infección. - Para la infección se usó sangre obtenida asépticamente por punción cardiaca o por la vena axilar de un ratón infectado con T. cruzi (15-18 días antes). Una gota de sangre de estos animales mostraba a la observación microscópica una gran cantidad de parásitos. La sangre se colocó en un tubo de ensayo que contenía 1-2 ml de SSI heparinizada estéril. De esta suspensión, se tomó una alícuota y se contó el número de parásitos/ml de la manera anteriormente descrita. Posteriormente, se diluyó la sangre con SSI estéril a una concentración de 4×10^4 tripomastigotes/ml. Inmediatamente se inoculó intraperitonealmente a los ratones en experimentación 0.5 ml. de la suspensión resultante, teniendo cuidado de mantenerla homogénea durante la operación. La cantidad utilizada para la infección corresponde a 51.6 LD₅₀, la cual provoca la muerte del 100% de los ratones empleados en el transcurso de 30 días.

Estudios histopatológicos. - El corazón de los animales que morían se fijó inmediatamente en una solución de formol al 10% amortiguada con fosfatos. Los órganos ya fijados, se incluyeron en bloques de parafina y se hicieron cortes de 6μ de espesor con microtomo rotatorio. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y

se montaron con bálsamo de Canadá (66). Se estudió un mínimo de 10 cortes de cada ratón.

Evolución de la infección con T. cruzi. - El desarrollo de la infección con T. cruzi en los grupos controles y los inmunizados con BCG se evaluó determinando el número de parásitos en sangre cada 5 día y por estudios histopatológicos del corazón a la muerte de los animales.

Evaluación de los resultados. - El efecto de la inmunización con BCG se estimó por la diferencia en el tiempo de supervivencia y en el número de parásitos en circulación entre los animales tratados y los controles. Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de la prueba U de Mann-Whitney (32). Por otro lado, se compararon cuidadosamente los resultados obtenidos en los estudios histopatológicos de los corazones de los animales de ambos grupos.

RESULTADOS

Efecto de la inmunización con BCG sobre el tiempo de supervivencia de ratones infectados con *T. cruzi*.

Como puede observarse en la Tabla I y en la Fig. 1, se logró inducir un grado de protección estadísticamente significativo ($P < 0.002$) en los ratones inmunizados con BCG antes de la infección con *T. cruzi*. El 100% de los animales no inmunizados (controles) murió a consecuencia de la infección con *T. cruzi*. La media aritmética del tiempo de supervivencia de estos ratones fue de 19.4 ± 0.83 días. Por otro lado, el 50% de los animales de este grupo murió antes de que los ratones inmunizados con BCG comenzaran a fallecer. Por el contrario, solamente el 60% de los ratones tratados con BCG sucumbieron y la media aritmética del tiempo de supervivencia de éstos resultó ser de 31 ± 3.31 días. Los ratones restantes de este grupo (40%) sobrevivieron hasta el final del experimento. Estos animales fueron sacrificados 70 días después de la infección con *T. cruzi* y sus corazones se sometieron a estudios histopatológicos.

Determinación de los niveles de parasitemia

La determinación de los niveles de parasitemia desde el día 10 hasta el día 25 después de la infección muestra que el número de tripomastigotes presentes en la sangre de los ratones inmunizados -

con BCG, fué significativamente menor ($P < 0.05$) que el de los animales controles (Fig. 2). Los animales inmunizados con BCG que sobrevivieron más de 25 días tenían un número reducido de parásitos en sangre, siendo difícil realizar el análisis estadístico de estos resultados. Además, los animales inmunizados con BCG que sobrevivieron y que se sacrificaron 70 días después de la inoculación con T. cruzi no mostraron ningún parásito a la observación microscópica de la sangre desde el día 30 después de la infección.

Estudios histopatológicos

El estudio histopatológico de los corazones de los ratones no inmunizados y de los inmunizados con BCG que sucumbieron a la infección con T. cruzi mostró un tipo similar de reacción inflamatoria, es decir, miocarditis intersticial crónica, difusa y una gran cantidad de nidos de amastigotes localizados principalmente en las paredes libres de los ventrículos (Fig. 3).

No obstante, entre los ratones inmunizados con BCG que sobrevivieron a la infección con T. cruzi y que se sacrificaron 70 días después de la inoculación, algunos no presentaron ningún tipo de lesión inflamatoria y otros mostraron una ligera inflamación crónica localizada entre las fibras del miocardio. Además, en estos animales no fué posible detectar parásitos intracelulares (amastigotes) (Fig. 4).

T A B L A I

Efecto de la inmunización con BCG sobre el tiempo de supervivencia de ratones infectados con Trypanosoma cruzi

G r u p o	Tiempo a la muerte	Promedio \pm E.S.	<u>p</u> ^a
	Días ^b		
No inmunizados	16		
	17		
	17		
	18		
	18		
	19		
	21		
	22		
	23		
		19.4 \pm 0.83	
Inmunizados con BCG	19		
	26		
	29		
	34		
	35		
	43		
	70		
	70		
	70		
		31.0 \pm 3.31 ^c	
			<0.002

^a El valor de P se determinó por la prueba U de Mann-Whitney

^b Los ratones inmunizados con BCG y los no inmunizados se infectaron con 2×10^4 (51.6 LD₅₀) tripomastigotes (día cero). Los números se refieren al tiempo de supervivencia después de la inoculación de - T. cruzi.

^c Media aritmética del tiempo de supervivencia de los primeros seis animales que murieron. Los 4 ratones restantes sobrevivieron y se sacrificaron 70 días después de la infección.

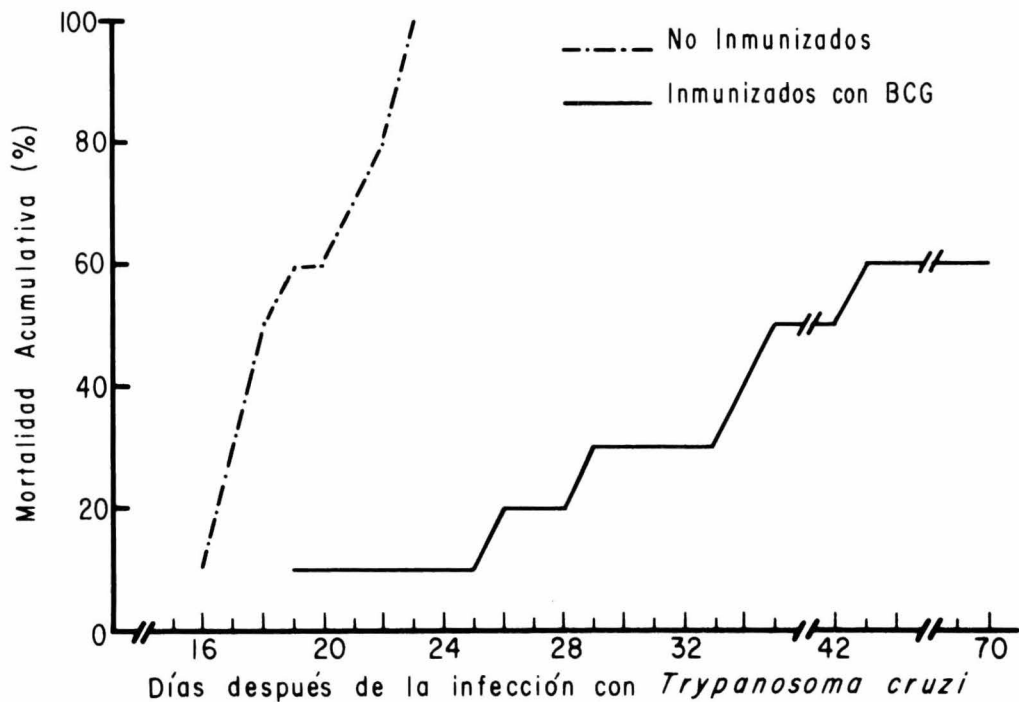


Figura 1. Efecto de la inmunización con BCG sobre la mortalidad de animales infectados con *T. cruzi*. El número inicial de animales en cada grupo fué de 10. Todos los ratones se infectaron con 2×10^4 (51.6 LD_{50}) parásitos (día cero).

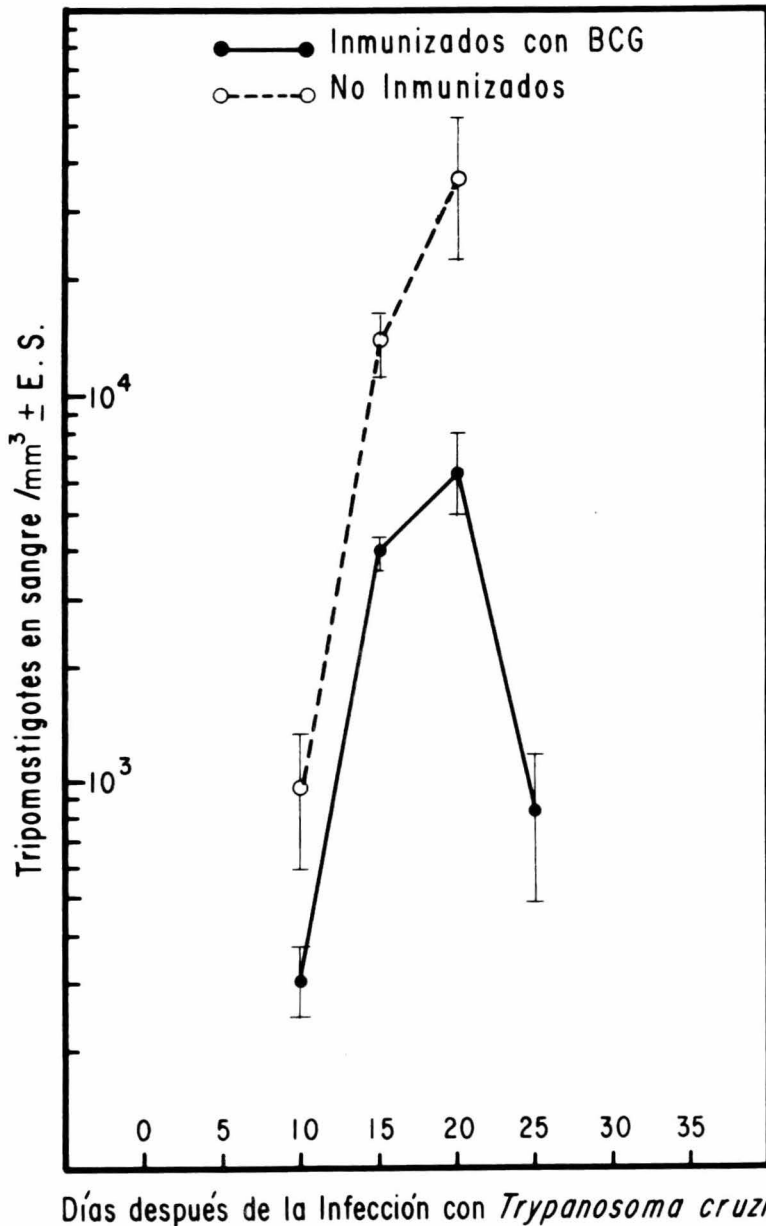


Figura 2 Determinación de tripomastigotes de *T. cruzi* en la sangre de los ratones inmunizados con BCG y en la de los no inmunizados. - Los ratones inmunizados con BCG mostraron a lo largo del experimento un número de tripomastigotes significativamente menor ($p < 0.05$) - que el de los animales controles.

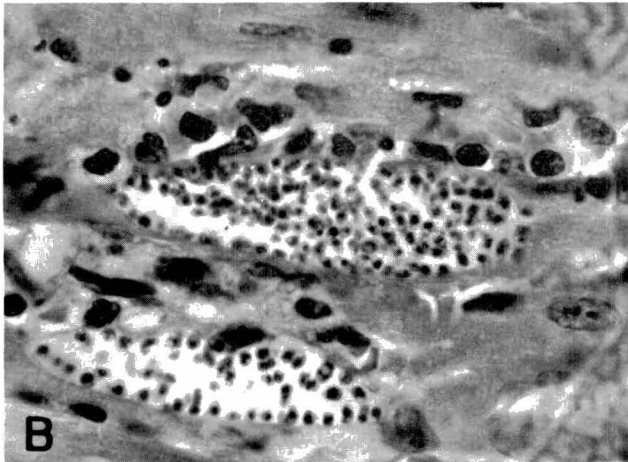
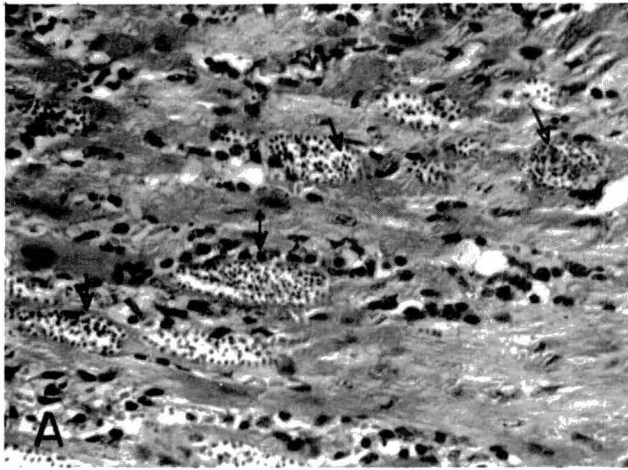


Figura 3. Cortes de músculo cardiaco de ratones infectados con 2×10^4 (51.6 LD₅₀) tripomastigotes de *T. cruzi*. Se observan numerosos nidos de amastigotes (flechas) y el infiltrado intersticial de células mononucleares. A) HE 280 X B) HE 800 X .

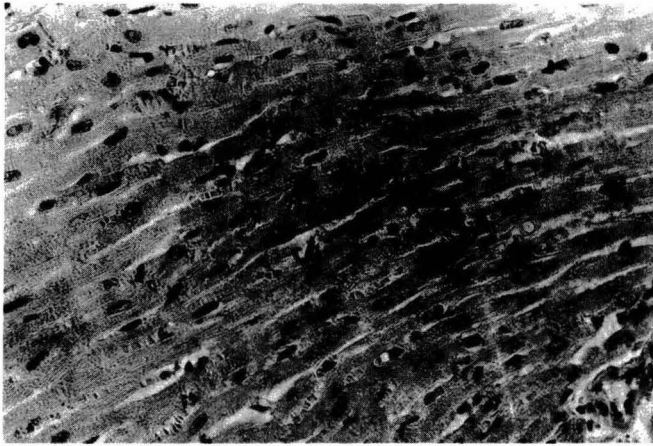


Figura 4. Cortes de los corazones de los ratones inmunizados con BCG que sobrevivieron a la inoculación de 2×10^4 ($51.6 LD_{50}$) - tripomastigotes de *T. cruzi* y que se sacrificaron 70 días después de la infección. Miocardio con características normales. HE 280 X.

DISCUSION

Los resultados obtenidos durante el presente estudio indican que es posible prevenir, mediante la inmunización con BCG, las manifestaciones agudas de la infección resultante de la inoculación de formas virulentas de T. cruzi en ratones.

A partir de los trabajos de Dubos y Schaedler (14), Blanden y col. (3), así como de los realizados por otros investigadores (12, 39, 61) se tienen datos de que la administración sistémica de BCG antes de la inoculación de ciertos microorganismos patógenos obstaculiza el desarrollo de la infección. Parece ser que, este efecto se debe a la existencia de poblaciones de macrófagos que han sido "activados" a través de los mecanismos de la IMC y que son capaces de eliminar inespecíficamente a una gran variedad de microorganismos, los cuales usualmente se multiplicarían en las células fagocíticas mono-nucleares normales (3, 41). Además, este fenómeno ha sido observado en muchas infecciones producidas por bacterias y protozoarios intracelulares (26, 30-31, 34, 41). Así mismo, se ha demostrado que el BCG ejerce un efecto inmunoestimulador de las reacciones que requieren la participación de los linfocitos T (33, 51).

Es probable que la protección inducida por el BCG contra la tripanosomiasis americana sea consecuencia de los mecanismos mencionados, ya que existen evidencias recientes de que los macró-

fagos de ratones inmunizados con BCG poseen capacidad significativamente aumentada para destruir T. cruzi in vitro en comparación con macrófagos provenientes de animales normales (65).

La determinación de tripomastigotes en la sangre de los animales usados en nuestros experimentos sugiere que la inmunización con BCG puede causar al menos en parte, la localización y eliminación de los parásitos en el sitio de la inoculación evitando su arribo a los tejidos y su proliferación intracelular masiva.

En los animales experimentales que sobrevivieron a la infección con T. cruzi no fué posible encontrar nidos de amastigotes en miocardio (Fig. 4), a pesar de que ellos mostraron tripomastigotes entre los 5 y 30 días después de la inoculación. Además los corazones de estos ratones revelaron un estado histológico aparentemente normal, que algunos autores (76) han relacionado a la ausencia de parásitos en los tejidos.

Por otra parte, desde los trabajos de Taliaferro y Pizzi (64) se ha propuesto que la fagocitosis y la digestión intracelular de los parásitos puede ser el mecanismo por medio del cual los macrófagos del huésped eliminan a T. cruzi. Esta idea ha sido apoyada por los datos obtenidos posteriormente por Scorza y Scorza (59) quienes realizaron estudios citoquímicos acoplados a microscopía electrónica en cortes

de corazones de ratas infectadas con T. cruzi, encontrando que los macrófagos del proceso inflamatorio ingieren los parásitos, los cuales son incluidos en fagosomas donde son digeridos a consecuencia de la fusión de éstos con lisosomas y de la liberación de las enzimas hidrolíticas (fosfatasa ácida) contenidas en estos últimos. Recientemente Tanowitz y col. (65) observaron parásitos en diferentes estadios de destrucción dentro de las vacuolas digestivas de macrófagos "activados" con BCG e infectados in vitro con T. cruzi.

Por otro lado, en experimentos realizados en nuestro laboratorio (49), se ha encontrado que los ratones infectados con T. cruzi desarrollan un estado de resistencia inespecífica a un microorganismo no relacionado (Listeria monocytogenes). Esta resistencia aumentada a Listeria, posiblemente mediada por mecanismos de IMC, fué observada a partir del cuarto día después de la infección con 2×10^4 tripomastigotes de T. cruzi y se asoció a un aumento en la actividad del sistema mononuclear fagocítico.

Por esto, se podría especular que la supervivencia de los ratones inmunizados con BCG antes de la infección con T. cruzi se debe a la cooperación de dos tipos de respuestas, ambas de IMC, que actuarían de manera conjunta. Una de ellas, sería la resistencia celular inespecífica inducida por la administración de BCG que permitiría la eliminación de gran cantidad de parásitos en el sitio de la inocu-

lación y la otra, una respuesta inmune específica contra T. cruzi. Este segundo mecanismo podría conducir a la destrucción de los parásitos que hayan sobrevivido y alcanzado los tejidos del huésped mediante la movilización de macrófagos al foco de infección por efecto de los PLAs liberados por los linfocitos. Es posible también que la actividad fagocítica y la capacidad microbicida aumentada de los macrófagos "activados" del hígado (células de Kupfer) y de la pulpa roja del bazo, pudieran tener un papel importante en la eliminación de estos parásitos ya que retendrían y aniquilarían los tripomastigotes circulantes evitando que pudieran infectar otras células somáticas.

La "activación" de macrófagos puede estar involucrada también en la destrucción de células somáticas infectadas, tales como las de músculo cardíaco (74). Si este mecanismo se presenta en nuestros experimentos, probablemente suceda en muy pequeña escala, ya que la destrucción tisular intensa hubiera conducido a la muerte, más que a la supervivencia de los animales inmunizados.

La posibilidad de que el BCG posea antígenos relacionados con los de T. cruzi no ha sido excluida en los presentes experimentos. No obstante, en un estudio reciente no se pudo encontrar relación antigénica entre T. cruzi y Mycobacterium smegmatis (48)

CONCLUSIONES

En el presente estudio, se demostró claramente que mediante la administración sistémica de BCG se confiere un alto grado de protección contra la infección resultante de la inoculación de formas virulentas de Trypanosoma cruzi en ratones.

Se postula que el efecto protector del BCG se debe a la inducción de mecanismos de inmunidad mediada por células, a través de los cuales, el huésped adquiere una población de macrófagos "activados" que le permiten destruir eficientemente al parásito por medio de la actividad microbicida aumentada de estas células fagocíticas.

Se considera que el modelo utilizado en nuestro trabajo es un sistema experimental de gran utilidad para investigar la participación de la inmunidad mediada por células en la evolución de la infección producida por T. cruzi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Andrade, Z.A. y Andrade, S.G.: Chagas' disease. En "Pathology of protozoal and helminthic diseases with clinical correlation, Editado por Marcial-Rojas, R.A., p. 69, The Williams and - Wilkins Co., Baltimore, Md., 1971.
- 2) Behbehani, M.K.: Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi infections in X-irradiated and in thymectomized mice. Trans. Roy.Soc. Trop. Med. Hyg. 65 : 265 (1971).
- 3) Blanden, R.V., Lefford, M.J., y Mackness, G.B.: The host - response to Calmette-Guérin bacillus infection in mice. J. Exp. Med. 129 : 1079 (1969).
- 4) Bluming, A.Z., Vogel, C.L., Ziegler, J.L., Mody, N., y Kanya, G.: Immunological effects of BCG in malignant melanoma: Two modes of administration compared. Ann. Int. Med. 76 : 405 (1972).
- 5) Brener, Z.: Biology of Trypanosoma cruzi . Ann. Rev. Microbiol. 27: 347 (1973).
- 6) Budzko, D.B., Pizzimenti, M.C., y Kierszenbaum, F.: Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: Immune lysis of virulent blood forms of Trypanosoma cruzi . Infect. Immun. 11 : 86 (1975).
- 7) Cerisola, J.A., Alvarez, M., Lugones, H., y Rebolan, J.B.: Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol. 24: 2 - (1969).
- 8) Chase, M.W.: The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59: 134 (1945).
- 9) Claman, H.N., Chaperon, E.A., y Triplett, R.F.: Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 122 : 1167 (1966).
- 10) Clinton, B.A., Ortiz-Ortiz, L., García, W., Martínez, T., y - Capín, R.: Trypanosoma cruzi I. Early immune responses at the cellular level by infected mice. Exp. Parasitol. 37 : 417 (1975)

- 11) Cohen, S., Bigazzi, P.W., y Yoshida, T.: Similarities of T. cell function in cell-mediated immunity and antibody production. - Cell. Immunol. 12: 150 (1974).
- 12) Coppel, S., y Youmans, G.P.: Specificity of acquired resistance produced by immunization with mycobacterial cell and mycobacterial fractions. J. Bacteriol. 97: 114 (1969)
- 13) Dennert, G.: Evidence for non-identity of T. Killer and T. Helper cells sensitized to allogeneic cell antigens. Nature (London) 249: 358 (1974).
- 14) Dubos, R.J., y Schaedler, R.W.: Effects of cellular constituents of mycobacteria on the resistance of mice to heterologous infections. I. Protective effect. J. Exp. Med. 106: 703 (1957).
- 15) Feldmann, M., y Basten, A.: Cell interactions in the immune - response in vitro. IV. Comparison of the effects of antigen-specific and allogeneic thymus-derived cell factors. J. Exp. Med. 136: 722 (1972).
- 16) Fowles, R.E., Fajardo, I.M., Leibowitch, J.L. y David, J.R.: - The enhancement of macrophage bacteriostasis by products of activated lymphocytes. J. Exp. Med. 138: 952 (1973).
- 17) Gentry, L.O., y Remington, J.S.: Resistance against Cryptococcus conferred by intracellular bacteria and protozoa. J. Infect. Dis. 123: 22 (1971)
- 18) Goble, F.C.: South american trypanosomes. En "Immunity to - parasitic animals. Editado por G.J. Jackson, R. Herman, y I. Singer, p. 597, Appleton-Century-Crofts, New York, 1970.
- 19) Godal, T., Rees, R.J.W., y Lmvik, J.O.: Lymphocyte-mediated - modification of blood-derived macrophage function in vitro; - inhibition of growth of intracellular mycobacteria with lymphokines. Clin. Exp. Immunol. 8: 625 (1971).
- 20) González-Cappa, S.M. Schmuñis. G.A., Traversa, O.C., Yanovsky, J.F. y Parodi, A.S.: Complement-fixation test, skin test, and experimental immunization with antigens of Trypanosoma cruzi prepared under pressure. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 17: 709 (1968)

- 21) Gutterman, J.U., McBride, C., Freireich, E.J., Mavligit, G., Frei, E., y Hersh, E.M.: Active immunotherapy with BCG for recurrent malignant melanoma. *Lancet* 1 : 1208 (1973).
- 22) Koberle, F.: Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of american trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6: 63 - (1968).
- 23) Krahenbuhl, J.L., y Remington, J.S.: In vitro induction of non specific resistance in macrophages by specifically sensitized lymphocytes. *Infect. Immun.* 4 : 337 (1971).
- 24) Landsteiner, K., y Chase, M.W.: Experiments on transfer of - cutaneous sensitivy to simple compounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49: 688 (1942).
- 25) Lane, F.C. y Unanue, E.R.: Requirement of thymus (T) lymphocytes for resistance to listeriosis. *J. Exp. Med.* 135: 1104 (1972)
- 26) Larsh, J.E., y Weatherly, N.F.: Cell-mediated immunity in - certain parasitic infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 67: 113 (1974).
- 27) Leibowitch, J., y David, J.R.: Lymphocyte-macrophage interaction in resistance to Listeria monocytogenes. *Federation Proc.* 31 : 610 (1972).
- 28) Lelchuck, R., Patrucco, A., y Manni, J.A.: Studies of cellular immunity in Chagas disease: Effect of glutaraldehyde-treated specific antigen on inhibition of leukocyte migration. *J. Immunol.* 112: 1578 (1974).
- 29) Lumsden, W.H.R.: Immune response to hemoprotozoa. En - Immunity to animal parasites". Editado por W.J.L. Soulsby, p. 287, Academic Press, Inc., New York & London, 1972.
- 30) Mackaness, G.B.: The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.* 120: 105 (1964).
- 31) Mackaness, G.B., y Blanden, R.V.: Cellular immunity. *Prog. Allergy.* 11 : 89 (1967).

- 32) Mann, H.B., y Whitney, D.R.: On a test of whether one of two - random variables in stochastically larger than the other. *Ann Math. Statis.* 18 : 50 (1947).
- 33) Mathé, G., Kamel, M., Dezfulian, M., Halle-Pannenko, O., y Bourrut, C. : An Experimental screening for "Systemic adjuvants of Immunity" applicable in cancer immunotherapy. - *Cancer Res.* 33 : 1987 (1973)
- 34) Mauel, J., y Behin, R.: Cell-mediated and humoral immunity to protozoan infections. *Transp. Rev.* 19 : 121 (1974).
- 35) McGregor, D.D., y Koster, F.T.: The mediator of cellular - immunity. IV. Cooperation between lymphocytes and mononuclear phagocytes. *Cell. Immunol.* 2: 317 (1971)
- 36) Mitchell, G.F., y Miller, J.F.A.P.: Cell to cell interaction in - the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or - thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128 : 821 (1968).
- 37) Mooney, J.J., y Waksman, B.H.: Activation of normal rabbit - macrophage monolayers by supernatants of antigen-stimulated lymphocytes. *J. Immunol.* 105: 1138 (1970)
- 38) Muniz, J., y Borrelío, A.: Estudo sobre a acao litica de diferentes seros sobre as formas de cultura e sanguicolas do *Schizotrypanum cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 5 : 563 (1945).
- 39) Nakamura, M., y Cross, W. R.: Susceptibility of rabbits Immunized with *Mycobacterium bovis* (BCG) or *Mycobacterium phlei* to - *Shigella* keratoconjunctivitis. *Infect. Immun.* 6 : 1025 (1972).
- 40) Nathan, C.F., Remold, H.G., y David, J.R.: Characterization of a lymphocyte mediator wich alters macrophage functions. *J. Exp. Med.* 137 : 275 (1973).
- 41) Nelson, D.S.: Macrophages as effectors of cell-mediated immunity. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1 : 353 (1972).
- 42) North, R.J.: The mitotic potential of fixed phagocytes in the liver as revealed during the development of cellular immunity. *J. - Exp. Med.* 130 : 315 (1969).

- 43) North, R.J.: Suppression of cell-mediated immunity to infection by an antimetabolic drug. *J. Exp. Med.* 132 : 535 (1970).
- 44) North, R.J. : Cellular mediators of anti-*Listeria* immunity as an enlarged population of short-lived, replicating T. Cells. *J. Exp. Med.* 138 : 342 (1973).
- 45) North, R.J.: Importance of thymus-derived lymphocytes in cell mediated immunity to infection. *Cell. Immunol.* 7 : 166 (1973).
- 46) North, R.J. : T. cell dependence of macrophage activation and - mobilization during infection with *Mycobacterium tuberculosis* Infect. Immun. 10 : 66 (1974).
- 47) Nossal, G J.V., Cunningham, A., Mitchell, G.F., y Miller, - J.F.A.P.: Cell to cell interaction in the immune response. III. Chromosomal marker analysis of single antibody-forming cells in reconstituted, irradiated or thymectomized mice. *J. Exp. Med.* 128 : 839 (1968).
- 48) Oelerich, S.: Antigenanalysen und Kreuzreaktionen zwischen - Leishmanien, *Trypanosoma cruzi* und *Mycobacterium smegmatis*. *Z. Tropenmed. Parasit.* 24 : 296 (1974).
- 49) Ortiz -Ortiz, L., Ortega, M. T., Capín, R., y Martínez, M.T.: Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* (En prensa).
- 50) Patterson, R.J., y Youmans, G.P.: Demonstration in tissue culture of lymphocyte-mediated immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.* 1 : 600 (1970).
- 51) Peters, L.C., Hanna, M.G., Gutterman, J.U., Mavligit, G.M., y Hersh, E.M.: Modulation of the immune response of guinea - pigs by repeated BCG scarification. *Proc. Soc. Exp. Biol. - Med.* 147 : 344 (1974).
- 52) Reed, L.F., y Muench, H.: A simple method of estimation of - fifty percent end-point. *Am. J. Hyg.* 27 : 493 (1938).
- 53) Remington, J.S., y Merigan, T.C.: Resistance to virus challenge in mice infected with protozoa or bacteria. *Proc. Soc. Exp. - Biol. Med.* 131 : 1184 (1969).

- 54) Roberson, E.L., y Hanson, W.L.: Trypanosoma cruzi: Effects of antithymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. Exp. Parasit. 34 : 168 (1973).
- 55) Roberson, E.L., y Hanson, W.L.: Transfer of immunity to T. cruzi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 68: 338 - (1974).
- 56) Ruskin, J., McIntosh, M., y Remington, J.S.: Studies on the mechanisms of resistance to phylogenetically diverse intracellular organisms. J. Immunol. 103 : 252 (1969).
- 57) Schmuñis, G.A., González-Cappa, S.M., Traversa, O.C. y Yanovsky, J.F.: The effect of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with Trypanosoma cruzi in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65: 89 - (1971).
- 58) Schmuñis, G.A., Vattuone, H., Szarfman, A., y Pesce, V.J.: Cell-mediated immunity in mice inoculated with epimastigotes or trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. Z. Tropenmed. Parasit. 24 : 81 (1973).
- 59) Scorza, C., y Scorza, J.V.: The role of inflammatory macrophages in experimental acute Chagasic myocarditis. J. Reticulo-endoth. Soc. 11: 604 (1972).
- 60) Seah, S.: Delayed hypersensitivity in Trypanosoma cruzi infection. Nature (London) 225 : 1256 (1970).
- 61) Senterfitt, V.C., y Shands, J.W. Jr. : Salmonellosis in mice - infected with Mycobacterium tuberculosis BCG II. Resistance to infection. Infect. Immun. 1 : 583 (1970)
- 62) Simon, H.B., y Sheagren, J.N. : Cellular immunity in vitro. I. Immunologically mediated enhancement of macrophage bactericidal capacity. J. Exp. Med. 133: 1377 (1971)
- 63) Simon, H.B., y Sheagren, J.N. : Enhancement of macrophage bactericidal capacity by antigenically stimulated immune Lymphocytes. Cell. Immunol. 4 : 163 (1972).

- 64) Taliaferro, W.H. y Pizzi, T.: Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi . J. Infect. Dis. 96 : 199 (1955).
- 65) Tanowitz, H., Wittner, M., Kress, Y., y Bloom, B.R.: - Studies of in vitro infection by Trypanosoma cruzi . I. - Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 24 : 25 (1975).
- 66) Taratuto, A.L., Yanovsky, J.F., Schmuñis, G.A., Traversa, O.C., González Cappa, S.M., y Parodi, A.S.: Histopathology in Rockland mice immunized against American - trypanosomiasis (Chagas' disease). Amerc. J. Trop. - Med. Hyg. 17 : 716 (1968).
- 67) Teixeira, A.R.L., y Santos-Buch, C.A.: The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preparation of - Trypanosoma cruzi antigens and humoral antibody response to these antigens. J. Immunol. 113: 859 (1974).
- 68) Teixeira, A.R.L., y Santos-Buch, C.A.: The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens. Immunology 28 : 401 (1975).
- 69) Tripathy, S., y Mackaness, G.B.: The effect of cytotoxic - agents on the pasive transfer of cell-mediated immunity. J. Exp. Med. 130 : 17 (1969).
- 70) Tschudi, E.I., Anziano, D.F., y Dalmasso, A.P.: Lymphocyte transformation in Chagas' disease. Infect. Immun. 6 : 905.
- 71) Vattuone, N.H., González Cappa, S.M., Menes, S., y - Schmuñis, G.A. Cell-mediated and humoral immune - response of mice infected with Trypanosoma-cruzi . - Z. Tropenmed. Parasit. 25 : 267 (1974).
- 72) Vilches, A.M. Katzin, A., Golfera, H., y Schmuñis, G.A. : The effect of heterologous anti-thymocyte serum upon the course of infection with Trypanosoma cruzi in mice. Z. Tropenmed. Parasit. 24 : 279 (1973).
- 73) Wahl, S.M., Wilton, J.M. Rosenstreich, D.L., y Oppenheim, J.J.: The role of macrophages in the production of - lymphokines by T. and B. lymphocytes. J. Immunol. 114: 1296 (1975).

- 74) WHO. Immunology of Chagas' disease. Bull. Wld. Hlth. Org. 50: 459 (1974).
- 75) Yanovsky, J.F., y Albado, E.: Humoral and cellular responses to Trypanosoma cruzi infection. J. Immunol. 109: 1159 (1972).
- 76) Yanovsky, J.F., Traversa, O.C., Taratuto, A.L., Schmuñis, G.A., González-Cappa, S.M., y Parodi, A.S.: Trypanosoma cruzi: Experimental immunization of mice. Exp. Parasitol. 26: 73 (1969).