

11261 lej 1  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA

INMUNOSUPRESION EN LA INFECCION EXPERIMENTAL CON  
T. CRUZI SOBRE LA RESPUESTA INMUNE PRIMARIA: EFECTO  
SOBRE LAS CELULAS INVOLUCRADAS EN LA FORMACION  
DE ANTICUERPOS

TESIS PRESENTADA POR  
MIGUEL FEOLI BONILLA  
PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS,  
ESPECIALIDAD MICROBIOLOGIA

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F., DICIEMBRE DE 1974



## **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 está 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.

## INDICE

Lista de tablas	i
Lista de figuras	ii
Introducción	1
Material y Métodos	
a) Material	12
b) Métodos	
Determinación de la $DL_{50}$ de tripomastigotes	12
Antígenos	13
Obtención del fragmento Fab' anti-eritro- citos de burro	14
Preparación del complejo Fab'-TNP	15
Antisueros	15
Transferencia pasiva de macrófagos	16
Preparación de la suspensión de linfocitos de bazo	16
Ensayo de placas de hemólisis	17
Tratamiento del exudado peritoneal de ratones con suero antitetha y anti-globuli- na-gamma	17
Respuesta inmune contra albúmina-TNP en ra- tones infectados con <u>T.cruzi</u> y ratones norma les	18

Determinación del número de células formadoras de Anticuerpos contra TNP	18
Sensibilización de eritrocitos de burro con Fab'- TNP	19
Determinación dosis-respuesta al antígeno BSA-TNP	19
Análisis estadístico	20
Resultados	21
Discusión	26
Referencias	29

## LISTA DE TABLAS

## Tabla

- I Efecto de la infección con T.cruzi sobre la respuesta inmune primaria a diferentes concentraciones de eritrocitos de burro (EB)
- II Transferencia de macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones inmunizados con eritrocitos de burro.
- III Respuesta inmune primaria de animales infectados con T.cruzi y animales normales contra eritrocitos de burro..
- IV Cinética de la formación de anticuerpos contra albúmina-TNP (BSA-TNP) y el efecto de la dosis sobre la misma
- V Efecto de la infección en ratones con T.cruzi sobre la respuesta inmune primaria al antígeno soluble albúmina-TNP (BSA-TNP).

## LISTA DE FIGURAS

- 1            Transferencia pasiva de macrófagos
  
- 2            Determinación del número de parásitos en animales infectados con T.cruzi.
  
- 3            Efecto de la infección con T.cruzi sobre la res puesta inmune primaria a eritrocitos de burro.

## INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas, es una infección que constituye uno de los mayores problemas de salud en muchos países. El agente causal de esta parasitosis es Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, el cual, produce casos patológicos que varían de estados sub-clínicos a letales en un corto o largo período de tiempo (1).

Así mismo, el daño, causado por T.cruzi en la enfermedad aguda, resulta en parte, de la destrucción de tejidos asociados con las fases intracelulares del parásito. Las cepas de T.cruzi tienen en su fase de tripomastigotes diferente habilidad para invadir tejidos específicos. Cepas retículo y miotrópicas representan extremos en este espectro; manifestando la primera generalmente mayor virulencia (2). Sin embargo, el sistema retículoendotelial juega un papel muy importante en la resistencia contra la infección (3). Además de los antecedentes mencionados, en nuestro laboratorio se han hecho experimentos para estudiar el efecto de la infección por T.cruzi, sobre la habilidad para formar anticuerpos contra antígenos no relacionados (eritrocitos de burro), encontrándose una inmunosupresión importante tanto en respuesta primaria como en respuesta secundaria (4).

La evolución de este estado de inmunosupresión se realizó por medio de titulación de anticuerpos circulantes y de cuantificación in vitro de células formadoras de anticuerpo.

Es de sobra conocido que en la respuesta inmune humoral intervienen tres tipos de células: macrófagos, linfocitos derivados del timo, llamados T, y linfocitos dependientes de la médula ósea, ó B, de los cuales nos ocuparemos en los siguientes párrafos:

Hay consideraciones directas e indirectas para establecer la importancia de las interacciones macrófago-linfocito en la inducción de la respuesta inmune (5-8). Las interacciones entre linfocitos sensibilizados y macrófagos, probablemente estén mediados por factores solubles y son de capital importancia en el lado efector de la respuesta inmune, mediada por células.

Existe una heterogeneidad funcional considerable en las poblaciones de macrófagos, y alguna de sus propiedades no están compartidas por las células llamadas fagocitos mononucleares o macrófagos (9-10). Como consecuencia se puede reflejar cambios mutacionales lineares en una población de monocitos o de macrófagos. En particular, las células



dentríticas o células reticulares asociadas con centros germinales (5) pueden especialmente adaptarse para capturar el antígeno e interaccionar con linfocitos. Estas células tienen una pronunciada capacidad para tomar al antígeno sobre su superficie en contraste con macrófagos del cordón medular o macrófagos de la cavidad peritoneal. Se piensa que puede ser mas interesante la presentación de antígeno sobre la superficie que la ingestión de antígenos y su degradación enzimática. Existan pocas evidencias que impliquen que otras células fagocíticas, por ejemplo, polimorfonucleares, sean importantes para la iniciación de la respuesta inmune (5).

Una dificultad particular en el estudio de macrófagos involucrados en la respuesta inmune y de los linfocitos precursores de la célula formadora de anticuerpo, resalta al análisis microscópico de estas células, ya que algunos precursores de monocitos que permanecen en la cavidad peritoneal (10) tienen la apariencia de linfocitos, y algunas células unidas a antígeno - en la cavidad peritoneal - tienen una morfología entre monocitos y linfocitos (11). El empleo de un suero anti-macrófago (6,12, 14), tampoco presenta evidencias inequívocas que ellos no dan reacción cruzada con linfocitos.

En todos estos sistemas es extremadamente difícil quitar todos los macrófagos y pequeños contaminantes que pueden ser suficientes en algunos casos para manifestar un efecto macrófago dependiente.

La extracción de macrófagos de suspensiones de linfocitos por métodos basados en adherencia, fagocitosis o con suero antimacrófago, abate la inducción de una variedad de respuestas del antígeno. Los macrófagos exentos de linfocitos dan solamente una respuesta proliferativa débil a antígenos solubles y a células alogénicas (13 - 16).

Se ha enfatizado que la dependencia de macrófagos para la producción de anticuerpos in vitro se correlaciona con la dependencia de célula T, siendo la forma físico-química del inmunógeno un factor crítico más importante que los determinantes antigénicos individuales. Esto es debido a que antígenos lentamente catabolizados, timo-independientes son efectivamente fagocitados, pero retenidos intracelularmente durante largo tiempo. Fishman y Adler (17) explican la respuesta de B como dependiendo de la interacción célula T - macrófago, sugiriendo, que la cooperación se presenta por la vía del "desprendimiento" del receptor de células T, que forma un complejo con el antígeno que es citofílico para la superficie del macrófago, iniciándose

así la respuesta de la célula B.

Hay evidencias que sugieren que el antígeno enlazado al macrófago tiene un efecto considerable para estimular la respuesta de linfocitos. Experimentos recientes con células de ratón in vitro han mostrado que el antígeno unido al macrófago constituye un "gatillo" muy efectivo para linfocitos T y B (18).

Una alternativa propuesta, la cual es menos fisiológica y objeto de considerables controversias, consiste en la inmunogenicidad de extractos sub-celulares de macrófagos o células en suspensiones ricas en macrófagos que han tomado antígeno (5, 7). Estudios hechos por Fishman y Adler y otros (17, 19, 20), muestran que extractos de macrófagos peritoneales obtenidos 30 minutos después de la ingestión del fago T<sub>2</sub> fueron altamente inmunogénicos e inducían una respuesta in vitro. Se demostró que la actividad inmunogénica estaba asociada con una fracción de RNA de bajo peso molecular, sensible a ribonucleasa. Este fenómeno fué inicialmente interpretado como evidencia de la transferencia de información genética macrófago-linfocito (17); sin embargo, estudios subsiguientes mostraron que la efi-

ciencia de tales preparaciones probablemente estaría adscrita a la presencia de pequeñas cantidades del antígeno altamente inmunogénico (20 - 21). También se demostró que el antígeno procesado por el macrófago llega a asociarse con RNA (22); esto es significativo, puesto que ocurre tanto con antígenos inmunogénicos como no inmunogénicos (23).

El tema que tratamos en esta introducción, nos permite enfatizar la dicotomía de la respuesta inmune; células T mediadoras de la respuesta inmune celular y las células B responsables de la respuesta humoral.

Es de todos sabido, que los anticuerpos juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta humoral. La "inhibición por retro-alimentación", ha sido demostrada por el efecto supresor específico que tiene el anticuerpo administrado pasivamente (24) y por el incremento de anticuerpos encontrados en circulación seguida a la renovación de anticuerpos del plasma por absorción en fase sólida con inmuno-adsorbentes (25).

La cooperación entre linfocitos T y B en la respuesta humoral fué inicialmente sugerida en 1966 por los experimentos de Claman y col. (26), quienes demostraron que

ratones irradiados tanto en timo como en médula ósea tenían una respuesta primaria mucho mayor a eritrocitos de carnero cuando se les reconstituía con inyecciones de células T y B que aquellos que recibían solamente células T o B. En 1967, Davies y col. (27) usando ratones timectomizados e irradiados, reconstituídos con médula singénica y adicionados de timocitos alogénicos, también demostraron la colaboración de células B y T en la respuesta a hemolisina contra eritrocitos de carnero. En 1968, Miller y Mitchell (28) encontraron que ratones timectomizados neonatalmente, no daban respuesta a eritrocitos de carnero, pero que dicha respuesta podría restaurarse con células de timo semialogénicas o con linfocitos del conducto torácico. Esto fué confirmado en ratones irradiados que recibieron células de timo de CBA, células de médula CBA/T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> y eritrocitos de carnero y en donde todas las células formadoras de anticuerpo obtenidas tenían el cromosoma T<sub>6</sub> y por tanto derivaban de la médula ósea (29).

La cooperación entre linfocitos T y B ha sido observada tanto in vitro como in vivo, en respuesta humoral primaria y secundaria y ha sido demostrada para una gran variedad de antígenos. En todos los casos, la célula B, es

la precursora de la célula secretora de anticuerpos.

Aunque hay muchas evidencias de la cooperación entre células B y T, no siempre es obligatoria para la respuesta inmune humoral. Por ejemplo, la IgM formada en respuesta a polisacárido de pneumococo tipo III (30), a lipopolisacárido de Escherichia coli, a polivinilpirrolidona (31) y a flagelina polimerizada (32), es timo-independiente, ya que no requieren de la ayuda de la célula T. En general se piensa que la respuesta de tipo IgG es más dependiente de timo que la respuesta de tipo IgM (33).

Generalmente, se considera una respuesta T-independiente cuando la respuesta de animales neonatalmente timectomizados, irradiado letalmente y reconstituido con médula o hígado fetal, o de ratones sin actividad tímica congénita, no dan una respuesta significativamente diferente de aquellos observados en controles apropiados usando un amplio rango de dosis de antígenos. También se ha demostrado en experimentos de transferencia celular la T independencia de algunos antígenos cuando el material por transferir ha sido tratado con suero anti- $\theta$  y complemento.

El objeto de este trabajo es el de estudiar el mecanismo responsable del abatimiento de la capacidad para formar anticuerpo en los animales infectados con T.cruzi.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que los macrófagos y los linfocitos T no están afectados como consecuencia de la infección con este parásito (34). La inmunocompetencia de la célula T ha podido ser establecida a través de la medición de la resistencia no específica contra Listeria monocytogenes, en ratones infectados con T.cruzi. Este fenómeno debido a la activación de macrófagos es posiblemente mediado por mecanismos inmunes de tipo celular. Estudios preliminares realizados in vitro sugieren que los linfocitos sensibilizados en presencia de antígeno de T.cruzi producen mediadores que aumentan la capacidad bactericida de los macrófagos normales. Los resultados obtenidos indican que en efecto, los macrófagos de los animales infectados con T.cruzi poseen una capacidad bactericida mucho mayor que los macrófagos normales. Esto puede considerarse como evidencia de que los linfocitos T del animal, se encuentran en condiciones normales (34).

En cuanto al estado funcional del macrófago, se ha encontrado que animales infectados con T.cruzi eliminan de circulación partículas de carbón coloidal en forma más eficiente que los ratones normales, indicándonos que las células fagocíticas no están incapacitadas como consecuencia de la infección, sino al contrario que su actividad fagocitaria está incrementada (34).

Para comprobar los resultados obtenidos en los experimentos de actividad fagocitaria con carbón coloidal, nos planteamos la necesidad de demostrar que efectivamente los macrófagos de animales infectados conservan la capacidad de cooperar con los linfocitos T y B en la respuesta inmune. Para ello realizamos experimentos en los cuales administramos eritrocitos de burro por vía intraperitoneal a animales infectados con T.cruzi y a animales normales. Posteriormente transferimos macrófagos libres de eritrocitos de burro de estos animales a otros normales. El exudado fué tratado con suero anti- $\theta$  y anti-globulina-gamma antes de hacer la transferencia, para eliminar la posibilidad de que estuvieran contaminados con linfocitos T y B. La respuesta inmune de los animales transferidos se midió por medio de placas formadoras de anticuerpos. Los ani-



males que recibieron macrófagos provenientes de animales infectados con T.cruzi mostraron un incremento en el número de células formadoras de anticuerpos en relación con los animales que recibieron macrófagos extraídos de animales normales.

Quedaban aún por averiguar, que sucedía a nivel de la vía eferente, es decir, a nivel de los linfocitos B. Para ello, diseñamos experimentos en los cuales los ratones infectados y normales recibieron un complejo acarreador-hapteno (BSA-TNP).

## MATERIAL Y METODOS

Animales.- Se utilizaron ratones hembras de la cepa Carworth Farm (CF1) de 18 a 23 g de peso. Los animales se mantuvieron en cajas de material acrílico y se alimentaron con tabletas de Purina (Purina de México, S.A. de C. V) y agua ad libitum.

Trypanosoma cruzi.- La cepa mio y reticulotrópica de T.cruzi fué obsequiada por el Dr. F.Navarrete, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal., México. Los ratones se inocularon intraperitonealmente (i.p.) con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes (51.6 LD<sub>50</sub>).

Determinación de la LD<sub>50</sub> de tripomastigotes.- La dosis letal de tripomastigotes necesaria para matar el 50% de ratones en un periodo de 30 días (LD<sub>50</sub>/30 días) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (35), y fué de 387 tripomastigotes/animal.

Nosotros usamos un inóculo que contenía  $2 \times 10^4$  tripomastigotes por animal que corresponde a una dosis letal

del 100%, o 51.6 veces la LD<sub>50</sub>.

Antígenos.- i) Se emplearon eritrocitos de burro (EB) lavados por 3 veces en solución salina isotónica y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^9$  células/ml. En todos los casos, los ratones se inocularon por vía (i.p.) con 0.5 ml de la suspensión de eritrocitos.

ii) Se preparó un complejo acarreador- hapteno de acuerdo a la siguiente técnica: Se disolvieron 0.25 g de carbonato de potasio en 50 ml. de agua y se añadieron 0.5 g de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma de México, S.A.). La solución se ajustó a un pH de 9.3. Se adicionaron con agitación y lentamente 50 ml de una solución acuosa de trinitro-fenol (TNP) (Eastman Organic Chemical, Rochester, N.Y.) al 1% y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Se dializó contra una solución salina balanceada de fosfatos, de pH 7.2 con cambios diarios del dializado hasta que no se demostró TNP libre. La determinación de TNP libre en el dializado se llevó a cabo en el espectrofotómetro a 360 nm. El número de grupos de TNP por molécula de proteína se calculó de acuerdo a la técnica descrita por Little y col. (36). El complejo tenía 5 grupos de TNP/molécula de proteína

Obtención del fragmento Fab'anti-eritrocito de burro. i) Obtención de la globulina-gamma. Se preparó el suero anti-eritrocito de burro según el método de Campbell (37). Se inocularón 4 conejos de 2.5 kg de peso con una suspensión de eritrocitos de burro al 20% previamente lavados 3 veces con solución salina isotónica. A cada uno se le aplicó inicialmente 1 ml por vía i.p. y luego por vía i.v. la misma dosis en los días 1,2,3,4,6,8,10,13,15 y 17. Ocho días después de la última inyección se determinó en el suero el título de anticuerpos específicos. Animales con títulos de anticuerpo aglutinantes mayores a 1:4000 fueron sangrados por punción cardiaca. Los sueros colectados se trataron con sulfato de amonio saturado para precipitar la globulina gamma. A continuación se determinó la concentración de proteína, por el método de Lowry y col. (38).

ii) Obtención del fragmento Fab'.- el fragmento Fab' se obtuvo de acuerdo al método descrito por Porter (39). Se incubaron 16 hr a 37°C; 136 mg de globulina gamma de conejo con 1.3 mg de mercuri-papaina en 10 ml de solución reguladora de fosfatos 0.1 M de pH 7.0, que contenían 0.01 M de cisteína y 0.002 M de etilendiaminotetraacetato de so-

dio (EDTA). Después de la incubación la solución fué dializada contra agua (cambios sucesivos con agitación vigorosa, durante 48 horas). La diálisis permite la eliminación de la cisteína y el EDTA, y facilita la oxidación e inactivación de la enzima. A continuación se dializó contra una solución amortiguadora de acetatos de pH 5.5. El material fué pasado por una columna de carboximetil-celulosa (CMC) y dializado contra solución salina. La columna de fraccionamiento empleada fué de 20 X 2.4 cms. La muestra liofilizada, se resuspendió en 20 ml de agua y se dializó contra agua destilada y se determinó la cantidad de proteínas por el método de Lowry y col. (38).

Preparación del complejo Fab'-TNP.- El conjugado Fab'-TNP, se preparó de acuerdo a la técnica descrita para preparar el complejo BSA-TNP. El conjugado tenía 5.6 grupos de TNP/molécula de proteína.

Antisueros.- El suero anti- $\theta$  de ratón fué adquirido en los laboratorios Bionetics (Maryland) y el suero anti-globulina-gamma de ratón fué proporcionado por el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

Transferencia pasiva de macrófagos.- Se inocularon i.p. 2 grupos de ratones, de 100 animales cada uno (los primeros infectados con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes de T.cruzi, 15 días antes de la iniciación del experimento y el otro grupo de animales normales), con 0.5 ml de una suspensión de eritrocitos de burro al 4%. Tres horas más tarde se lavó la cavidad peritoneal con solución salina balanceada de Hanks estéril (SSB). El proceso fué repetido tres veces. El exudado peritoneal obtenido de los dos diferentes grupos fué tratado por separado durante 5 minutos a temperatura ambiente con 5 ml de una solución de cloruro de amonio al 0.83% y posteriormente lavado tres veces con SSB. Las células fueron contadas en cámara Neubauer y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml. Dos grupos de ratones normales fueron inyectados i.v. con una alicuota de  $1 \times 10^7$  macrófagos libres de EB extracelulares, obtenidos de la cavidad peritoneal de animales infectados con T.cruzi y de animales normales. Cuatro días más tarde se determinó el número de células formadoras de anticuerpo contra eritrocitos. El proceso se esquematiza en la Fig. 1.

Preparación de la suspensión de linfocitos de bazo.

La suspensión de células linfoides se preparó presionando cada bazo sobre una malla de acero inoxidable con solución

salina balanceada de Hanks (SSB). Las células se lavaron 3 veces y se resuspendieron posteriormente en el volúmen deseado de SSB. La cuenta de células viables se hizo sobre una cámara de Neubauer con el método de exclusión del azul tripano.

Ensayo de placas de hemólisis.- El ensayo de placas de hemólisis detecta las células formadoras de anticuerpo (CFA). El método se realizó en laminas portaobjetos de acuerdo al método descrito por Golub. y col (43). La cuenta descrita de CFA se hizo en una suspensión de células de bazo, cuatro días después de la administración del antígeno y las células incubadas en presencia de complemento 1:10 en SSB forman placas de lisis. El número de CFA se calculó por el método de Golub y col (43).

Tratamiento del exudado peritoneal de ratones con suero antiteta y anti-globulina-gamma.- Experimentalmente se usaron células obtenidas de ratones infectados con T.cruzi (15 días después de la infección) y células peritoneales de ratones normales. Las células del exudado peritoneal obtenidas 3 horas después de ser inyectados i.p. con eritrocitos de burro y posteriormente tratadas con cloruro de amonio y lavadas con SSB fueron purificadas con sueros anti- $\theta$  y antiglobulina-gamma. Las células se ajustaron a -

una concentración de  $40 \times 10^6$  células/ml (40) y se agregó suero anti- $\theta'$  a una concentración final de 1:40 y de suero anti-globulina/gamma 1:50. Se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente se lavaron las células 2 veces con SSB y se agregó complemento de cobayo 1:10. La mezcla se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 45 minutos. Después de lavar 3 veces con SSB se ajustó la concentración de células viables a  $10^8$  células/ml. Grupos de ratones normales fueron inyectados i.v. con 0.1 ml de la suspensión de células así tratadas. La determinación del número de células formadoras de anticuerpos en los animales transferidos con las células peritoneales fué realizada por una modificación al método de Jerne y Nordin (43).

Respuesta inmune contra albúmina - TNP en ratones infectados con T.cruzi y ratones normales.- Ratones infectados con T.cruzi y ratones normales se inmunizaron con 200 ug de albúmina - TNP. Siete días después de la inmunización se determinó el número de células formadoras de anticuerpo contra TNP usando como antígeno de prueba eritrocitos de burro recubiertos con Fab'-TNP (43).

Determinación del número de células formadoras de anticuerpo contra TNP.- Los animales se sacrificaron y se



obtuvieron los linfocitos del bazo por presión del mismo - sobre una malla de acero. Las células linfoides se lavaron con SSB. Las células obtenidas se trataron con 2 ml de cloruo de amonio al 0.83% y después de lavarlas 3 veces, se - resuspendieron en 1 ml de SSB y 0.1 ml de la suspensión se mezcló con 0.4 ml de agarosa y 0.05 ml de eritrocitos de - burro previamente sensibilizados con el fragmento Fab'-TNP. Las placas de lisis que correspondían a células formadoras de anticuerpos anti-TNP, se revelaron en presencia de complemento diluido 1:10 en SSB (43).

Sensibilización de eritrocitos de burro con Fab'  
TNP.- Los glóbulos rojos de burro se recubrieron con el - Fab'-TNP por el método descrito por Strausbauch y col. (42), por incubación del conjugado Fab'-TNP con eritrocitos de - burro al 8% en SSB por 60 minutos a 37°C, seguido de 3 lava dos con SSB. La suspensión de eritrocitos sensibilizados fué resuspendida en SSB a una concentración del 10%. Los - eritrocitos sensibilizados fueron probados por hemaglutina ción contra un antisuero anti-TNP obtenido de ratones inmu nizados con BSA-TNP.

Determinación dosis-respuesta al antígeno BSA-TNP.- Se inocularon 3 diferentes dosis del complejo BSA-TNP a 3 gru

## RESULTADOS.-

Determinación del número de parásitos en animales infectados.- Los niveles de parasitemia se determinaron - por cuenta directa en sangre a los 4, 9, 12, 15, 18, 20 y 25 días después de la infección con T.cruzi. La cuenta - de tripomastigotes de T.cruzi en animales infectados en sangre y corazón se muestran en la Fig. 2. Como puede observarse, el número de tripomastigotes, aumentó durante el experimento a partir del quinto día de infección en forma progresiva hasta alcanzar su máximo el día 25 (Fig. 2 A).

En la Fig. 2B observamos, que a partir del día 9 se presentan nidos de amastigotes en el corazón de los animales infectados con T.cruzi. El análisis microscópico revela un incremento de amastigotes, que aumenta hasta el día 20 del experimento en donde su número comienza a disminuir. Así mismo, el peso del corazón, aumentó gradualmente a lo largo del experimento. La diferencia en peso observada - después del día 18 de la infección, entre los animales infectados y el grupo control, fué significativa ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2C).

pos de 5 ratones cada uno. Las dosis estudiadas fueron - 200, 400 y 800 ug. También se probó la acción de 300 ug del conjugado, inoculado con adyuvante completo de Freund. Las células formadoras de anticuerpo se determinaron 7 días después por el método de Jerne y Nordin (41) modificado por Golub y col. (43).

Análisis estadístico.- Para determinar la homogeneidad de varianzas entre los grupos de animales, se usó la prueba de Fisher. Cuando estos grupos fueron homogéneos la prueba t de Student Fisher (44) se aplicó para estimar el significado de las diferencias principales. Cuando las varianzas fueron heterogéneas la prueba u de Mann-Whitney (45) fué usada para determinar el significado de estas diferencias.

Efecto de la infección con T.cruzi sobre la respuesta inmune primaria a eritrocitos de burro. Como puede verse en la Fig.3 las células formadoras de anticuerpo (CFA) en ratones infectados con T.cruzi e inmunizados con eritrocitos de burro a diferentes intervalos de tiempo, - no muestran diferencias significativas durante los primeros días del experimento cuando se comparan con ratones inmunizados pero no infectados. Sin embargo, a partir del día 11, el grupo infectado muestra una disminución significativa en el número de estas células ( $P < 0.01$ ).

Efecto de la infección con T.cruzi sobre la respuesta inmune primaria a diferentes concentraciones de eritrocitos de burro. Se infectaron ratones con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes de T.cruzi y 15 días después se inmunizaron con diferentes concentraciones de eritrocitos de burro, Como puede verse en la Tabla I la respuesta de CFA contra EB disminuyó en todos los casos a niveles significativos en los animales infectados.

Transferencia de macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones inmunizados con eritrocitos de burro.  
El número de células formadoras de anticuerpo (CFA)/bazo

de animales normales y de animales infectados con T.cruzi se esquematiza en la Tabla II. Los experimentos indican - que los macrófagos de animales infectados manifiestan en to dos los casos una mayor capacidad fagocítica a eritrocitos de burro que los animales del grupo control. Sin embargo -- esta diferencia solamente fué significativa en el experimento 2.

En el experimento 3 (Tabla II), el exudado peritoneal fué tratado con sueros anti- $\theta$  y anti-globulina-gamma, para descartar la participación en la transferencia de linfocitos T y B. Como puede verse la eliminación de células T y B no alteró el comportamiento de los macrófagos en su capacidad fagocítica, la cual, permaneció aumentada (Tabla II), aunque éste aumento no fué significativo.

Paralelamente al experimento de transferencia de - macrófagos se incluye en la Tabla III; la respuesta a eritrocitos de burro de un grupo infectado en relación a un grupo control, notándose una vez más la respuesta disminuída a niveles significativos en el grupo infectado. Es interesante enfatizar la respuesta disminuída de estos animales ya que las células peritoneales transferidas reportadas en la Tabla II fueron de animales similarmente tratados.

Efecto de dosis-respuesta a TNP en ratones normales.- Se ha observado que animales infectados con T.cruzi muestran una respuesta inmune disminuída a antígenos particulados como eritrocitos de burro. Esta vez, estudiamos la respuesta de animales infectados a un antígeno soluble no relacionado, como fué el complejo albúmina de suero bovino conjugado a trinitrofenol (BSA-TNP).

Se determinó la cinética de aparición de células formadoras de anticuerpo anti-TNP a la vez que se probaron diferentes dosis del complejo hapteno-acarreador. La Tabla IV, muestra dicho efecto, notándose que el número de CFA, tiene su máximo el séptimo día después de la inmunización y que de las 3 diferentes dosis de inmunización estudiadas, 200 ug del BSA-TNP era la dosis que daba mayor número de CFA.

Efecto de la infección con T.cruzi sobre la respuesta inmune primaria al antígeno soluble BSA-TNP.- Los resultados que describe la tabla V, muestra que en las fases iniciales de la infección no hay supresión de la respuesta inmune, sino por el contrario se observa mayor número de CFA en el grupo de animales infectados. A medida

que avanza la infección a (partir del día 8), comienza a disminuir el número de CFA y cuando el grupo de animales infectados se inmuniza con BSA-TNP después del día 8, hay una supresión significativa en el número de células formadoras de anticuerpo anti-TNP ( $P < 0.01$ ).

## DISCUSION

Los resultados que aquí se reportan indican que ratones infectados con tripomastigotes de T.cruzi presentan una respuesta disminuída en su comportamiento inmune contra antígenos heterólogos. Esta inmunodepresión se observó tanto cuando se inmunizó con un antígeno particulado - como uno soluble. A medida que aumenta el grado de parasitemia en animales infectados con T.cruzi se manifiesta un abatimiento marcado en la respuesta inmune de estos animales a antígenos heterólogos no relacionados. El efecto depresivo en el número de células formadoras de anticuerpo - durante el curso de la infección experimental está acompañado de bajos niveles de anticuerpos circulantes (4), en tanto, que en las fases iniciales de la misma cuando todavía no se observa aumento en el número de tripomastigotes, el sistema inmuno-competente del animal permanece inalterado.

El aumento en el grado de parasitemia en el torrente sanguíneo por tripomastigotes, lleva en el curso de la infección experimental, a la formación de nidos de amastigotes en tejidos específicos, como el corazón, produciendo mio



carditis intersticial difusa, crónica e intensa que afecta esencialmente las paredes libres de ambos ventrículos (46) y que produce aumento de peso, iniciándose, entonces, una disminución en los parásitos en el torrente circulatorio.

Una de las posibilidades para explicar la reducción en el número de células formadoras de anticuerpo contra eritrocitos de burro, es la competencia inmunológica. Sin embargo, el efecto supresor de la respuesta inmune en los animales infectados es aún evidenciada cuando se aumenta la concentración del antígeno considerablemente, concluyéndose, que la marcada inmunosupresión causada por la infección con T.cruzi no es debida a un efecto competitivo del antígeno.

Los experimentos de transferencia de macrófagos de animales infectados con T.cruzi indican que el macrófago conserva su capacidad fagocítica, como lo demuestra el hecho, de la avidéz para capturar eritrocitos de burro. Dicho efecto, es debido únicamente al macrófago, ya que el exudado peritoneal transferido, se privó de la participación de linfocitos T y B por el tratamiento con sueros anti  $\theta$  y anti-globulina gamma.

La supresión en la respuesta inmune fué también demostrada con antígenos solubles (BSA-TNP), en donde específicamente medimos la respuesta del animal contra el hapteno TNP. Es necesario mencionar que mientras la respuesta al acarreador es T dependiente, la del hapteno es B dependiente. Basados en los experimentos previos a este trabajo efectuados con L.monocytogenes, en donde se demuestra la activación de linfocitos T en animales infectados con T.cruzi; los experimentos de limpieza de carbón como índice de actividad fagocítica retículo-endotelial y los estudios de transferencia de macrófagos que aquí se reportan, así como la supresión que se pone de manifiesto contra TNP, podemos sugerir, que la inmunosupresión producida por T.cruzi, se lleva a cabo por una alteración a nivel de linfocitos B. Sin embargo, es necesario usar antígenos T-independientes para confirmar esta suposición

REFERENCIAS

1. Koberle, F., Chagas 'disease and Chagas' syndromes. The pathology of American trypanosomiasis. Adv. Parasitol. 6: 63, 1968
2. Goble, F.C. Pathogenesis of blood protozoa, p. 237, Soulsby, E.J.L. (ed). Biology of Parasites. Academic Press, New York, N.Y. 1966
3. Yanovsky, J.F., Traversa, O.C., Taratuto A.L., González Cappa, S.M., y Parodi, A.S., Trypanosoma cruzi: Experimental immunization of mice. Exp. Parasitol, 26: 73, 1969
4. Martínez, M.T., García, W. y Ortiz-Ortiz, L., VI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, México, D.F. México, 1973
5. Nossal, C.J.V. y Ada, G.L., Antigens, Lymphoid Cells and the Immune Response. Academic Press, New York, 1971
6. Schwartz, R.S., Ryder, R.J. W. y Gottlieb, A.A. Macrophages and antibody synthesis, Progr. Allergy, 14: 81, 1970
7. Unanue, E.R. y Cerottini, J.C. The function of macrophages in the immune response. Sem.Haematol., 7: 225, 1970

8. Unahue, R.R. y Cerottini, J.C. The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages, *J. Exp. Med.*, 131: 711, 1970
9. Cohn, Z.A. The structure and function of monocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* 9: 163, 1968
10. Van Furth, R. The origin and turnover of promonocytes, monocytes and macrophages in normal mice. p. 151 En Van Furth, R. (ed.) Mononuclear phagocytes. Blackwell Oxford, 1970
11. Mandel, T., Byrt, P. y Ada, G.L. A morphological examination of antigen-reactive cells from mouse spleen and peritoneal cavity. *Exp. Cell. Res.*, 58: 170, 1969.
12. Shortman, K. y Palmer, J. The requirement for macrophages in the in vitro immune response. *Cell. Immunol.* 2: 399, 1971
13. Oppenheim, J., Leventhal, B.G. y Hereh, E.M. The transformation of column purified lymphocytes with nonspecific and specific antigenic stimuli, *J. Immunol.* 101: 262, 1968
14. Cline, M.J. y Swett, V.C. The interaction of human monocytes and lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 128: 1309, 1968.

15. Hersh, E.M. y Harris, J.E. Macrophage-Lymphocyte interaction in the antigen induced blastogenic response of human peripheral blood lymphocytes, *J. Immunol.* 100: 1184, 1968
16. Seeger, R. y Oppenheim, J.J. Macrophage bound antigens I. Induction of delayed hypersensitivity and priming for production of serum antibodies in guinea pigs. *J. Immunol.* 109: 244, 1972
17. Fishman, M. y Adler, F.L., The role of macrophage-RNA in the immune response. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 32: 343, 1967
18. Kartz, D.H. y Unanue, E.R. Critical role of determinant presentation in the induction of specific responses in immunocompetent lymphocytes, *J. Exp. Med.* 137: 967, 1973
19. Fishman, M. Antibody formation in vitro. *J. Exp. Med.* 114: 837 1961
20. Askonas, B. A. y Rhodes, J.M. Immunogenicity of antigen-containing RNA preparation from macrophages. *Nature (Lond.)* 205: 470, 1965
21. Gottlieb, A.A., Glisin, V.R. y Doty, P. Studies in macrophage-RNA involved in antibody production. *Proc. Nat. Acad. Sc. (Wash)*, 57: 1249, 1967

22. Campell, D.H. y Garvey, J. S. Nature of retained antigen and its role in the immune response, *Adv. Immunol.* 3: 261, 1963
23. Roelants, F. E. y Goodman, J. W. Immunological studies on the poly- $\gamma$ -D-glutamyl capsule of Bacillus anthracis, IV. The association with peritoneal exudate cells ribonucleic acid of the polypeptide in immunogenic and non immunogenic forms. *Biochemistry* 7: 1432, 1968
24. Urh, J. W. y Moller, G. Regulatory effect of antibody on the imune response. *Adv. Immunol.*, 8: 81, 1968
25. Graf. M. W. y Urh, J.W. Regulation of antibody formation by serum antibody. I. Removal of specific antibody by means of immunoadsorption. *J. Exp. Med.* 130: 1175, 1969
26. 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
27. Davies, A. J. S. Leuchars, E., Wallis, V., Marchant R, y Elliott, E. V. The failure of thymus derived cells to make antibody. *Transplantation*, 5: 22, 1967

28. Miller, J. F. A. P. and Mitchell, G. T. Cell-to-Cell interaction in the immune response, I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. J. Exp. Med. 128: 801, 1968
29. 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 and thymectomized mice. J. Exp. Med., 128: 839, 1968
30. Howard, J. G., Christic, G.H., Courtenay, B.M. y Biozzi, E. Studies on immunological paralysis. VIII. Pneumococcal polysaccharide tolerance and immunity differences between the Biozzi high and low responses lines. Europ. J. Immunol., 2: 269, 1972
31. Anderson, B. y Blomgren, H. Evidence for thymus-independent humoral antibody production in mice against polyvinylpyrrolidone and E. coli lypopolysaccharide. Cell. Immunol., 2: 411, 1971.
32. Feldmann, M. y Basten, A. The relationship between antigenic structure and the requirement for thymusderived cells in the immune response. J.Exp.Med. 134: 103, 1971

33. Taylor, R. B. y Wortis, H.H. Thymus-dependence of antibody response: variation with dose of antigen and class of antibody. *Nature (Lond)*, 220: 927, 1968
34. Ortega, M. T., Capin R., Martínez, M.T. y Ortiz-Ortiz L. Inmunidad celular en ratones infectados con T.cruzi X Reunión Nacional Soc. Mex. de Bioquim., A.C., Mérida (Yuc.) México, Nov. 1974
35. Reed, L. F., y Muench, H. A simple method of estimation of 50% en point. *Amer.J. Hyg.* 27: 493, 1938
36. Little, J. R. y Eisen, H. N. The IgM and IgA immune response the TNP determinant group in BALB/e Mice *Meth. Immunol. Immunochem.* 1: 128, 1967
37. Campbell, D.H. Garvery, J.S., Gremer, N. E. y Sussdorf, D. H. Methods in Immunology. Benjamin W. A., Inc. New York, 1963
38. Lowry, O.H., Rosebraugh, N.K., Farr., A.L. y Randall R. J. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951
39. Porter, R. R., The structure of gamma globulins and antibodies p. 177, En Gellhorn, A. y Hirschberg, E. (eds.) Basic Problems of Neoplastic Disease, N.Y.: Columbia Univ., Press, New York, 1962



40. Clinton, B. A. Magog, J. J. y Aspinal, R. L. The abrogation of macrophage migration inhibition by pretreatment of immune cells with anti- $\theta$  antibody and complement, *J. Immunol.*, 5: 1741, 1974
41. Jerne, N. K. y Nordin A. A., Plaque formation in agar by single cell antibody-producing cells. *Science* 140: 405, 1963
42. Stransbauch, P., Sulica, A. y Givol D. General method for detection of cells producing antibodies against haptens and proteins. *Nature*. 227: 68, 1970
43. Golub, E. S., Mitchell, R. I., Weigle, W. A. y Dutton R. W. A modification of the hemolytic plaque assay for use with protein antigens. *J. Immunol.*, 100: 133, 1968
44. Fisher, R. A., Statistical methods for research workers (5 ed.) Edinburg: Oliver y Boyd, 1934
45. Mann, H. B. y Whitney, D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.*, 18: 50, 1947
46. Ortiz-Ortiz, L., González, A. y Lamoyi, E. I. Comunicación personal.

TABLA I

Efecto de la infección con T. cruzi sobre la respuesta inmune primaria a diferentes concentraciones de eritrocitos de burro

Dosis (%)	CFA/10 <sup>6</sup> células de bazo $\pm$ error estandar			<u>P</u>
	Normales		Infectados	
10	10 288.2 $\pm$ 5 890.7		319.8 $\pm$ 215.4	< 0.05 <sup>a</sup>
50	767.6 $\pm$ 357.1		18.1 $\pm$ 8.5	< 0.02 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> El valor de P fué calculado de acuerdo al método de t de Student-Fisher

<sup>b</sup> El valor de P se calculó por el método de Mann-Whitney

TABLA II

Transferencia de macrófagos obtenidos de cavidad peritoneal de ratones inmunizados con eritrocitos de burro

Donador	CFA/bazo $\pm$ error estandar		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3 <sup>a</sup>
Normal	544.0 $\pm$ 152.0	1987.3 $\pm$ 256.7	593.6 $\pm$ 33.0
Infectados con <u>T. cruzi</u>	747.4 $\pm$ 264.9	8174.6 $\pm$ 1231.0	1387.3 $\pm$ 312.8
<u>p</u> <sup>b</sup>	> 0.05	< 0.02	> 0.05

<sup>a</sup> Exudado peritoneal tratado con suero anti- $\theta$  y anti-globulina antes de la transferencia

<sup>b</sup> El valor de p fué calculado por comparación de grupos normales con los infectados. La prueba de t de Student-Fisher fué usada cuando las varianzas fueron homogéneas y la de Mann-Whitney cuando las varianzas fueron heterogéneas

TABLA III

Respuesta inmune primaria de animales infectados con T. cruzi y animales normales  
contra eritrocitos de burro <sup>a</sup>

Experi- mento #	C F A/ bazo <sup>†</sup>			<u>p</u> <sup>d</sup>	error estandar		
	Normales	Infectados			Normales	Infectados	
	Macrófagos transferidos a ratones normales obtenidos de animales: <sup>b</sup>						
							<u>p</u> <sup>d</sup>
1	5627.8 <sup>±</sup> 476.3	1615.9 <sup>±</sup> 255.1	< 0.05	544.0 <sup>±</sup> 152.0	747.4 <sup>±</sup> 264.9	>0.05	
2	23629.6 <sup>±</sup> 5180.7	2755.8 <sup>±</sup> 1357.8	< 0.02	1987.3 <sup>±</sup> 256.7	8174.6 <sup>±</sup> 1231.0	<0.02	
3	8054.2 <sup>±</sup> 199.5	886.9 <sup>±</sup> 77.3	<0.05	593.6 <sup>±</sup> 3.3	1387.3 <sup>±</sup> 312.8	>0.05	

<sup>a</sup> Los animales infectados con T. cruzi recibieron  $2 \times 10^4$  tripomastigotes, 15 días antes del experimento.

<sup>b</sup> Datos de la Tabla I, incluidos solamente con fines comparativos.

<sup>c</sup> Exudado peritoneal tratado con suero anti- $\theta$  y anti-globulina gamma antes de la transferencia.

<sup>d</sup> El valor de p fué calculado de acuerdo al método de t de Student-Fisher para varianzas homogéneas y con el método de Mann-Whitney para varianzas heterogéneas.

TABLA IV

Cinética de la formación de anticuerpos contra albúmina-TNP (BSA-TNP) y el efecto de la dosis sobre las células formadoras de anticuerpo (CFA)

Día <sup>a</sup>	CFA/10 <sup>7</sup> células de bazo		
	ug de BSA-TNP:		
	200	400	800
4	7	3	5
7	77	14	27
9	54	32	43

<sup>a</sup> Días después de la inmunización con BSA-TNP

TABLA V

Efecto de la infección en ratones con T. cruzi, sobre la respuesta inmune primaria al antígeno soluble albúmina-TNP (BSA-TNP)

Inmunización con BSA-TNP <sup>a</sup>	CFA/10 <sup>7</sup> células $\pm$ error estandar <sup>b</sup>			<u>p</u> <sup>c</sup>
	Control	Infectados		
-4	27.3 $\pm$ 7.6	36.4 $\pm$ 6.9		> 0.05
2	53.8 $\pm$ 7.7	48.2 $\pm$ 15.2		> 0.7
8	53.8 $\pm$ 7.6	12.0 $\pm$ 3.7		< 0.01
12	52.4 $\pm$ 4.0	19.4 $\pm$ 7.3		< 0.01

<sup>a</sup> El día de la inmunización reportado, está calculado en base al día de la infección con T. cruzi (día 0)

<sup>b</sup> La determinación de CFA fué hecha 7 días después de la inmunización con BSA-TNP

<sup>c</sup> El valor de p fué calculado de acuerdo al método de t de Student-Fisher

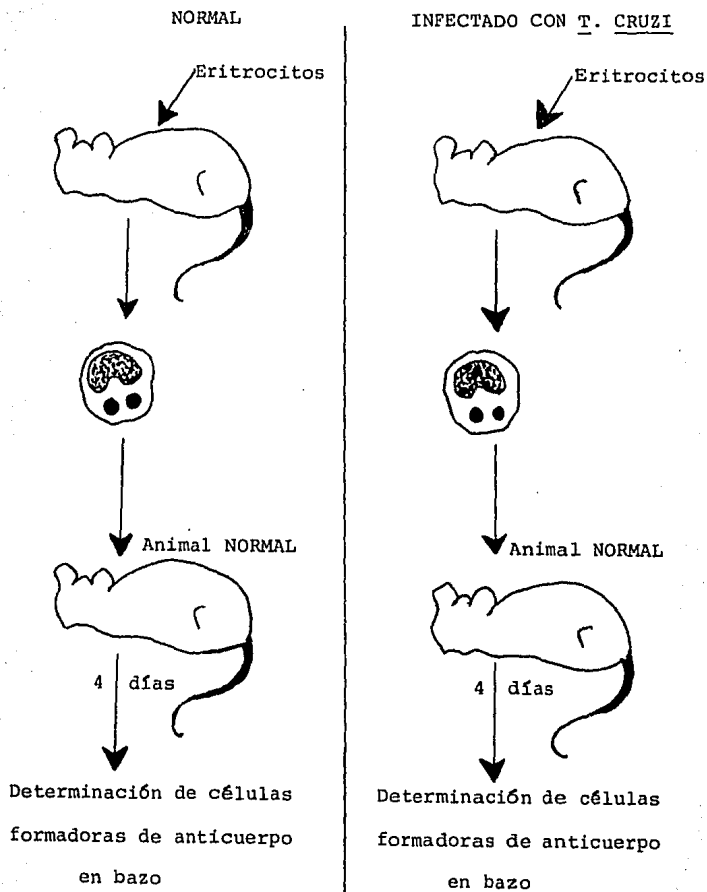


Fig. 1 Transferencia pasiva de macrófagos

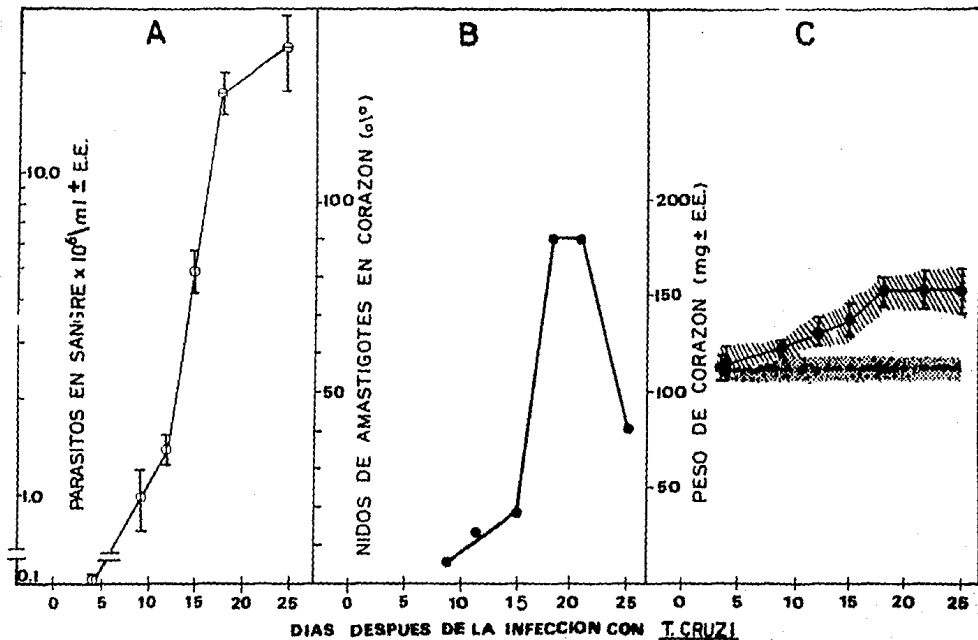


Fig. 2 Determinación del número de parásitos en animales infectados con *T. cruzi*



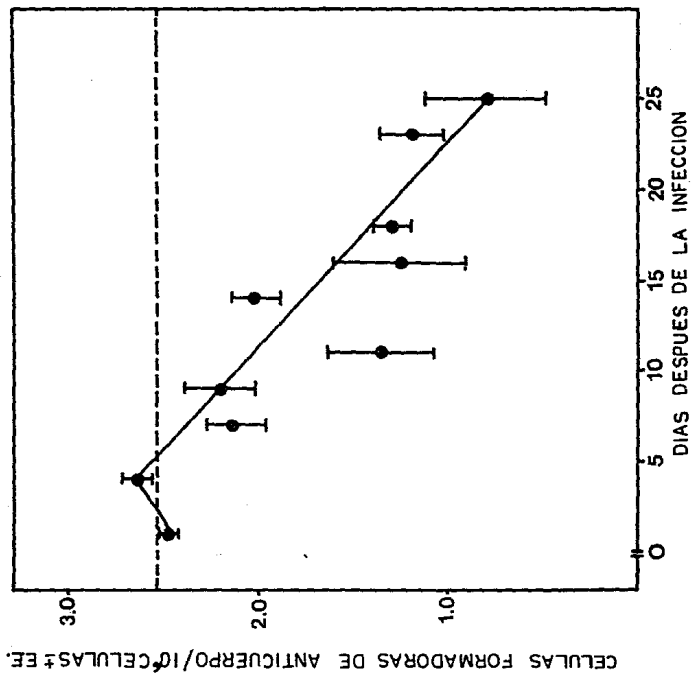


Fig. 3 Efecto de la infección con T. cruzi sobre la respuesta inmune primaria a eritrocitos de burro.