

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

225715

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

**INMUNOMODULACION DE LA CICLOFOSFAMIDA Y UN
EXTRACTO ANTIGENICO EN UN MODELO MURINO
INFECTADO POR *Trypanosoma cruzi*.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
BIOLOGIA EXPERIMENTAL PRESENTA :**

BIOL. RICARDO MARQUEZ VELASCO.

DIRECTOR DE TESIS : DR. RAFAEL BOJALIL PARRA

ASESOR INTERNO : DR. RUBEN DARIO MARTINEZ

ASESOR EXTERNO : M. EN C. LUIS I. TERRAZAS VALDES

**REALIZADO EN : Depto. de Inmunología, Instituto Nacional
de Cardiología "Ignacio Chávez". Financiado por el CONACyT
con fondos del proyecto 0535PM.**

México D. F. Septiembre de 1997.

DEDICATORIAS

A mis padres y mis hermanos con quienes he compartido mis triunfos, fracasos y en quienes puedo confiar plenamente. Gracias por enseñarme que el verdadero tesoro es aquel que se consigue con lucha y tenacidad. A Lupita por apoyarme en los momentos difíciles y mostrarme que siempre hay un mañana que tal vez puede ser mejor.

A mis viejos amigos Juan, Victor y Fausto en quienes he encontrado sinceridad y al resto de mis buenos amigos quienes no cabrían en esta página.

A la memoria de dos grandes seres la Sra. Conchita de Garay y a Betito...

El camino es largo y a lo largo de este se encuentra todo tipo de elementos emocionales: alegría y tristeza, amor y desamor, aliento y desaliento, sinceridad e hipocresía, valentía y cobardía, tenacidad y derrota, conocimiento e ignorancia ; en pocas palabras lo positivo y lo negativo, pero piensa solo por un momento que tu estancia aquí no debe ser en vano, que tienes la capacidad, la energía, el poder y la libertad de conseguir lo imaginable siempre y cuando recojas del camino los elementos que te permitan hacer a un lado la escoria, lo malo y aprendas a saltar las piedras que entorpecerán tu camino...

Anónimo

AGRADECIMIENTOS

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana cuenta con el apoyo de CONACyT según el convenio PFPN/66/92.

Mi agradecimiento al CONACyT por otorgarme la beca con el número de registro 91612 durante el transcurso de esta Maestría.

Gracias al Depto. de Patología y en especial al Biól. David Cruz y al Dr. Romeo García por el apoyo prestado para realizar el estudio histopatológico requerido en este estudio.

Mi más profundo agradecimiento y admiración para mi comité tutorial integrado por el Dr. Rafael Bojalil Parra, M. en C. Luis I. Terrazas Valdés y Dr. Rubén Dario Martínez. Gracias por su dedicación y paciencia.

A todo el personal del departamento de Inmunología con quienes interacciono a diario y que me facilitan las cosas para poder continuar por este camino, en especial a Maru y Soco y sin olvidar al resto de mis compañeros...

Otras personas a quienes les agradezco son Chayo, Sali, Gloria y Eneida por el optimismo que me han inyectado en mis ratos de estrés.

Y muy especialmente a Dios...

INDICE	PAGINA	
I	Resumen	4
II	Introducción	6
	• Epidemiología	8
	• Ciclo de vida	8
	• Fases de la Infección	10
III	Antecedentes	11
	• Ciclofosfamida (Cf)	13
	• Farmacocinética de la Cf	14
	• Efectos Inmunológicos de la Cf	15
IV	Justificación	17
V	Objetivos e hipótesis	18
VI	Metodología	19
	• Animales	20
	• Parásitos	20
	• Tratamientos	20
	• Infecciones	20
	• Cinética de la parasitemia	21
	• Procesamiento de la sangre	21
	• Sacrificio, obtención de órganos y procesamiento para el estudio histopatológico	21
	• Cultivos celulares	22
	• Cuantificación de citocinas por ELISA	22
	• Determinación de la DTH	23
	• Determinación de las subclases de anticuerpos por ELISA	24
	• Análisis estadístico	24
VII	Resultados	25
	• Cinética de la parasitemia	25
	• Producción de citocinas	25
	• Respuestas inmune celular y humoral	32
	• Daño tisular	35
VIII	Discusión	41
IX	Conclusiones	52
X	Bibliografía	53
XI	Apéndice	60

Abreviaturas

Ap.- Apéndice

cAMP- Adenosin monofosfato cíclico

Cf- Ciclofosfamida o tratamiento con este fármaco

DTH- Respuesta de Hipersensibilidad Retardada

FC.- Fibra cardiaca

FM.- Fibra muscular

Fig.- Figura

HE- Hematoxilina-eosina

H₂O₂- Peróxido de Hidrógeno

IFN- Interferon

IL- Interleucina

Imm- tratamiento con el extracto antigénico

Imm+Cf- Tratamiento mezclado del fármaco más el antígeno

RI- Respuesta Inmune

KCl- Cloruro de Potasio

KH₂PO₄- Fosfato de Potasio

LIT- Infusión de Hígado y Triptosa

MHC- Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MN- Infiltrado de células mononucleares

NaCl- Cloruro de sodio

Na₂HPO₄- Fosfato de sodio

NO- Oxido Nítrico

NP- Necrosis parcial

NT- Necrosis total

PBS- Solución Buffer de Fosfatos

rmlL- Interleucina recombinante murina

TCR- Receptor de células T

TGF- Factor de Crecimiento Transformante

I) Resumen

El predominio de citocinas tipo Th1 (IFN- γ e IL-2) o Th2 (IL-4 e IL-10) parece jugar un papel central en el desarrollo de diversos procesos infecciosos, estas respuestas pueden ser moduladas mediante la administración de fármacos o extractos antigénicos. En el presente estudio se evaluaron los efectos de la 1) ciclofosfamida (**Cf**) que en varios modelos se ha observado que potencia la respuesta de hipersensibilidad retardada (**DTH**) (fenómeno mediado por citocinas tipo Th1), 2) el de un extracto antigénico total de epimastigote cultivado "in vitro" (**Imm**) y que favorece el establecimiento de una respuesta inmune humoral (fenómeno mediado por citocinas tipo Th2) y 3) el de un tratamiento combinado (**Imm+Cf**); con la finalidad de inducir diferentes ambientes de citocinas y determinar de que manera influyen sobre el desarrollo de la infección por *Trypanosoma cruzi* (**T.cruzi**). Para cumplir este objetivo se administraron los tratamientos Imm, Cf e Imm+Cf a ratones Balb/c que posteriormente fueron infectados con 1000 tripomastigotes procíclicos de *T. cruzi* de la cepa Ninoa vía i.p. Durante los 7, 14, 27, 35 y 60 días posteriores a la infección se evaluaron el grado de parasitemia, la producción de citocinas de células de bazo estimuladas con Con A, la DTH, la producción de anticuerpos de las subclases IgG2a e IgG2b y el daño tisular. Los resultados mostraron que la parasitemia medida en el día 27 aumentó 54% ($p < 0.05$) en el grupo Cf y por el contrario el tratamiento Imm+Cf la disminuyó en un 38% ($p < 0.05$) además de retrasar una semana el día pico. El análisis de citocinas mostró en primer lugar que los niveles basales (preinfección) de IL-2 fueron potenciados significativamente por el tratamiento con Cf ($p < 0.05$), el Imm aumentó la de IL-4, mientras que el grupo Imm+Cf sólo produjo IFN- γ . Después de infectar a los animales sin tratar, desarrollaron una respuesta mixta de citocinas (IFN- γ , IL-2 e IL-10) hasta el día 27 y después dominó un patrón tipo Th1. Los animales tratados con Imm mostraron un patrón de citocinas similar al del grupo control aunque con mayores niveles de IFN- γ e IL-4; en el grupo Cf también se produjo

IFN- γ en concentraciones similares, los niveles de IL-2 fueron abatidos y los de IL-10 se mantuvieron bajos hasta el día 35 y al día 60 se observó un dominio tipo Th1. Cabe resaltar que solo en los animales del grupo Imm+Cf se detectaron niveles similares de IFN- γ e IL-10 hasta el día 27, un retraso de una semana en su pico y aunque después se observó un ligero incremento de citocinas tipo Th1, en ningún momento se dejaron de producir las tipo Th2. La respuesta inmune celular (DTH) fue similar entre los grupos durante las cuatro semanas de estudio. La respuesta humoral mostró un predominio de la IgG2a para el día 60 en todos los grupos y sólo en los animales tratados con Imm+Cf los niveles de IgG2b (respuesta tipo Th2) aumentaron antes que en los demás, además de que fueron similares a los de IgG2a (potenciada por una respuesta tipo Th1) hasta el día 35. Por último los tratamientos Imm e Imm+Cf indujeron el menor grado de infiltrados inflamatorios y de necrosis tisular en el músculo y el corazón al finalizar la fase aguda de la infección. Lo anterior sugiere que el tratamiento Imm+Cf fue capaz de conferir la mayor protección sistémica, y este fenómeno posiblemente fue mediado por un ambiente mixto de citocinas (Th1/Th2), lo que sugiere que este patrón puede ser más importante en el control de la infección de *T. cruzi* que una respuesta polarizada hacia alguno de los extremos.

II) INTRODUCCION

Como respuesta a las infecciones, los mamíferos han desarrollado mecanismos inmunológicos capaces de eliminar un gran número de agentes extraños, dentro de este gran proceso conocido como **respuesta inmune (RI)** se han identificado etapas claves para la activación de respuestas **celulares y humorales**.

Los macrófagos son de las primeras células que intervienen en el encendido de la maquinaria inmunológica ; tienen la capacidad de fagocitar proteínas e inclusive microorganismos completos, procesarlos mediante enzimas proteolíticas en su interior y presentar los antígenos en forma de péptidos pequeños asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (**MHC II**). Durante esta etapa los macrófagos liberan citocinas proinflamatorias (**IL-1, TNF- α e IL-12**) que favorecen la activación de linfocitos T CD4+ (**Paul W, 1994**), los cuales tienen la capacidad de reconocer antígenos específicos sobre MHC II mediante el receptor de células T (**TCR**) formando un complejo **MHC-TCR**. Una vez que las primeras células T CD4+ mediadoras de la inmunidad celular se activan, se inicia la producción de IL-2 e IFN- γ que a su vez facilitan la activación de otras células, induciendo expansión clonal y potenciación de la capacidad antimicrobiana de los macrófagos mediante el aumento en la producción de NO y H₂O₂.

Los linfocitos B también son importantes en este proceso ya que tienen una dualidad de funciones, por una parte detectan antígenos globulares circulantes por medio de sus receptores de superficie (Inmunoglobulinas) y presentan fragmentos de antígenos extraños sobre moléculas del MHC II al TCR de linfocitos T CD4+ formando el complejo MHC-TCR ; este mecanismo es similar al requerido para la inmunidad celular, con la excepción de que las citocinas producidas por estas células T CD4+ son la IL-4 e IL-10 que inducen la diferenciación de las células B hacia células plasmáticas productoras de diferentes subclases de anticuerpos específicos (**Paul W, 1994**).

En la actualidad se conocen dos subpoblaciones T CD4+ mediadoras de estos fenómenos y cuya diferencia radica en el patrón de producción de citocinas: los linfocitos Th1 (**IFN- γ e IL-2**) que favorecen principalmente la respuesta inmune celular y Th2 (**IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13**) que potencian la respuesta humoral (**Mosmann T y Coffman R, 1989**).

Se reconoce que la presencia de estas células es fundamental en el desarrollo de diferentes infecciones y que el establecimiento de alguno de los perfiles puede ser importante en la respuesta contra un agente infeccioso. De manera general se acepta que las citocinas tipo Th1 confieren resistencia en contra de infecciones intracelulares (por parásitos, bacterias y virus) y que las tipo Th2 parecen tener esta misma función sobre infecciones extracelulares (**Romagnani S, 1994**), trabajos recientes parecen sugerir que esto no siempre se cumple, tal es el caso de la infección por *Candida albicans* (**Romani L et al, 1994**) y *Taenia crassiceps* (**Bojalil R et al, 1993**), que aunque son parásitos extracelulares, la protección parece ser conferida por un perfil tipoTh1.

Se desconoce el perfil de citocinas que se produce y el papel que desempeñan durante la infección con parásitos bifásicos (ciclo de vida intra y extracelular), como es el caso de *T.cruzi*, que requiere infectar células para reproducirse y del torrente circulatorio sanguíneo para diseminarse e infectar otros tejidos.

Epidemiología

T. cruzi es el agente causal de la llamada Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, la cual afecta entre 16 y 18 millones de individuos en 17 países de América Latina y se estima que existen alrededor de 100 millones en riesgo de contraer la enfermedad de manera natural (WHO, 1991); en adición la transfusión sanguínea es otra vía de contagio y de hecho es la causa de infección en lugares donde la transmisión natural no sucede como en los Estados Unidos (Nickerson P et al, 1989 . Virchhoff L, 1993).

En México los primeros casos de Chagas fueron registrados en 1940 (Mazzotti L, 1940) y a partir de esta fecha los estudios seroepidemiológicos han demostrado que en diversas regiones del país existen poblaciones en contacto con el parásito y con riesgo de infectarse (Velasco O et al, 1992).

Ciclo de Vida

El ciclo de vida de este parásito (Fig. 1) se lleva a cabo en dos etapas: la primera se desarrolla en los vectores transmisores como *Pastrongylus megistus*, *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus* en cuyo intestino se establece la fase de tripomastigote metacíclico, cuando el vector se alimenta con la sangre de un organismo vertebrado expulsa heces u orina contaminada con el parásito y este ingresa al organismo por el orificio de alimentación o cualquier otra lesión cutánea , a partir de este momento se inicia la segunda etapa del ciclo; el parásito ingresa a la sangre del hospedero e infecta células como macrófagos y fibroblastos adyacentes a la lesión, dentro de estos el parásito se transforma en amastigote que se reproduce por fisión binaria hasta romper la célula y salir como tripomastigote sanguíneo con la subsecuente reinfección de otras células y tejidos (Virchhoff L, 1993). Un mecanismo alterno de infección lo llevan a cabo los propios amastigotes,

quienes inmediatamente después del romper la célula se unen a otras células adyacentes y las infectan (Burleigh B y Andrews N, 1995).

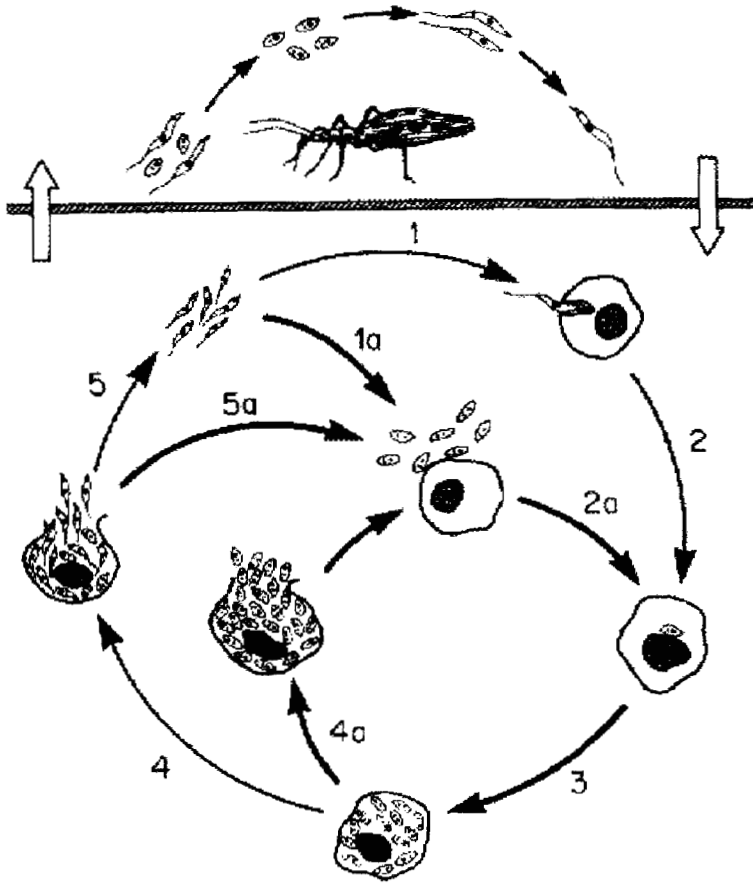


Fig. 1 : En el paso 1 los tripomastigotes metacíclicos que se liberan en las heces del insecto entran al vertebrado por el orificio de alimentación u otra herida infectando células del hospedero ; paso 2 : los parásitos escapan de la vacuola y se transforman en amastigotes ; paso 3 : se replican en el citoplasma ; paso 4 : se diferencian en tripomastigotes procíclicos ; paso 5 : son liberados al romperse la célula hospedera ; pasos 4a y 5a : un subciclo alternativo en el vertebrado ocurre cuando los amastigotes se liberan a partir de una ruptura prematura o (paso 1a) cuando se diferencian extracelularmente en amastigotes, en este caso son ingeridos por macrófagos pero sobreviven y completan el ciclo (Tomado de Burleigh B y Andrews N, 1995)

Fases de la Infección

En humano se han identificado dos fases de la infección, la fase aguda que se caracteriza por altos niveles de parásitos en sangre y tejidos, con una duración de 4-8 semanas, las manifestaciones clínicas son : fiebre, malestar general, adenomegalia, hepatomegalia, miocarditis y meningo encefalitis, en ocasiones cuando la infección es por conjuntiva se observa edema facial (signo de Romaña) ; por desgracia solo el 4% de los casos es detectable por su sintomatología (**Faust E et al, 1979. Monteon V, 1993**). En el ratón la fase aguda persiste aproximadamente 2 meses, aunque su duración depender de las cepas del parásito y del animal y se pueden observar alteraciones similares a las que se desarrollan en humanos.

Durante la fase crónica se pueden observar bajos niveles de parásitos en sangre y en los humanos ocasiona lesiones irreversibles después de 10-20 años. Entre las manifestaciones del daño en miocardio se consideran la presencia del bloqueo completo de la rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo y bloqueo atrio ventricular asociado con ondas T y extrasístoles ventriculares, falla cardiaca y muerte súbita. Las alteraciones cardiacas también son reproducibles en el modelo Chagásico de ratón (**Cuneo C y Molina de Raspi E, 1989. Cruz D, 1994**).

III) Antecedentes

Los modelos de resistencia o susceptibilidad a infecciones por *Plasmodium falsiparum* (Taylor-Robinson A et al, 1993 . Perlmann H et al, 1994), virus de inmunodeficiencia humana (Maggi E et al, 1994), helmintos (Svetic A et al, 1993 . Else K et al, 1994 . King Ch et al, 1995), *Plasmodium chabaundi* (Stevenson M y Tam M, 1993), hongos (Romani L y Howard D, 1995) y bacterias como *Klebsiella pneumoniae* (Greenberger M et al, 1995) sugieren que el patrón de producción de citocinas tipo Th1/Th2 está estrechamente relacionado con el desarrollo de la infección; probablemente el caso más claro se observa en Leshmaniasis, donde el IFN- γ confiere resistencia, mientras que la IL-10 se relaciona con susceptibilidad (Kemp M et al, 1993. Soares R et al, 1994).

En la Tripanosomiasis murina se han realizado pocos estudios longitudinales al respecto, por lo que no se ha establecido una relación de este tipo y lo que se conoce se desprende de estudios transversales. Se ha reportado que durante la fase aguda de la infección se detectan altos niveles de IFN- γ y una marcada disminución de IL-2 y en menor grado la de IL-3 (Tarleton R, 1991). La disminución en la síntesis de IL-2 se ha corroborado mediante la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Soong L y Tarleton R, 1994. Vandekerckove F et al, 1994) y por el contrario la producción de IL-4 e IL-10 aumentan (Rottenberg M et al, 1995. Barbosa de Oliveira L et al, 1996).

La administración de interleucinas recombinantes murinas (ILrm) ha permitido hasta cierto punto conocer el efecto de cada una sobre el desarrollo de la infección, en este contexto se sabe que al agregar rmlFN- γ a cultivos de macrófagos peritoneales murinos (MPM) se favorece la capacidad de asociación de estas células con el parásito, además de inhibir su grado de replicación y el porcentaje de células infectadas (Wirth J et al, 1985. Golden J y Tarleton R, 1991. Silva J et

al, 1992..); por otro lado al administrar esta citocina “in vivo” en momentos previos a la infección, se induce disminución de los niveles de parásitos y el grado de mortalidad (**Cardillo F et al, 1996**), este fenómeno se relaciona con el aumento de la producción H_2O_2 (**Wirth J et al, 1985**) y de NO (**Mogliorini P et al, 1991**). Por otro lado al administrar de rmlL-2 a células de bazo procedentes de ratones infectados, incrementa la producción espontánea de IFN- γ y la inducida por el Ag del parásito(**Tarleton R, 1991**). Además los MPM incubados con rmlL-4 muestran bajos porcentajes de células infectadas y número de parásitos intracelulares (**Wirth J et al, 1988**).

Otra medio para evaluar el efecto de las citocinas “in vivo” es mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, en este contexto se ha observado que al administrar anti-IFN- γ se incrementa la mortalidad de ratones infectados con la cepa Tulahuen del parásito (**Torrinco F et al, 1991**) y este fenómeno es similar en cepas susceptibles y resistentes de ratón (**Silva J et al, 1992**). Con estas metodologías también se ha observado que la producción de IFN- γ es fundamental durante etapas tempranas de la infección ya que si la anticitocina se administra 11 días después del inicio, no se modifica la sobrevivencia de los animales y cuando se inyecta entre a los 30 o 60 días de infección, tampoco se observa un recrudecimiento de la enfermedad (**Cardillo F et al, 1996**).

Otras citocinas también parecen ser importantes en la protección, en un estudio se utilizó un sobrenadante rico en IL-2, IL-4 e IL-5 y potenció a los MPM para eliminar tripanosomas, pero al administrar anti-IL-4 el efecto fue abatido y esto no sucedió al administrar anti-IL-2 o -IL-5 (**Golden J y Tarleton R, 1991**). Por otro lado la inyección de anti-IL-4 “in vivo” indujo resistencia en contra de una cepa reticulotrópica del parásito (**Pereira M et al, 1996**). Estos resultados sugieren que la IL-4 parece tener un efecto protector que depende de la presencia de otras citocinas.

Por su parte la IL-10 se ha relacionado con la susceptibilidad y esto es apoyado por dos evidencias: a) esta citocina tiene un efecto inhibitor de la producción de IFN- γ y b) la

administración de anti-IL-10 disminuye los niveles de mortalidad de animales infectados y bloquea el efecto inhibitorio de la producción del IFN- γ (**Reed S et al, 1994**).

Estas evidencias parecen indicar que el IFN- γ juega un papel protector en etapas tempranas de la infección y que bajo ciertas condiciones la IL-4 también puede ser protectora, mientras que la IL-10 parece modular efectos adversos.

Una estrategia alternativa para evaluar el papel de estas respuestas es mediante la utilización de fármacos "inmunomoduladores". Recientemente se ha descrito el efecto de algunos de estos sobre la producción de citocinas específicas, en este caso se encuentra la talidomida que "in vitro" favorece que las células mononucleares sanguíneas humanas produzcan IL-4 e IL-5, pero inhibe la producción de IFN- γ (**McHug S et al, 1995**). La clorpromazina que por una parte inhibe la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), la producción de citocinas como IL-2, IFN- γ e IL-4 y favorece la producción de IL-10 (**Tarazona R et al, 1995**) y la ciclofosfamida (Cf) que debido a que potencia la DTH parece ser un candidato para favorecer la respuesta tipo Th1 (**Parish N et al, 1995**).

Ciclofosfamida

La Cf es un agente alquilante cuyos grupos alquilo se unen covalentemente a otras moléculas incluyendo fosfatos, aminos, sulfidrilos, carboxilos y grupos imidazol, además de las bases púricas del ADN, principalmente al nitrógeno 7 de la guanina, de esta manera interfiere con la proliferación celular (**Calabresi P y Parks R, 1980**).

Farmacocinética de la Cf

La Cf no tiene actividad alquilante y no es citotóxico por si mismo, por lo que requiere ser metabolizada (**Fig. 2**), el proceso se lleva a cabo en la fracción microsomal de las células hepáticas y se inicia con la hidroxilación del carbono 4 del anillo oxazafosforina por el citocromo P-450, como producto inicial se forma la 4-hidroxiciclofosfamida que es altamente citotóxico pero químicamente inestable, este metabolito espontáneamente se inactiva al abrirse su anillo oxafosforina y formar aldofosfamida; estos productos son degradados enzimáticamente mediante la aldehído deshidrogenasa formando 4-cetociclofosfamida y carboxifosfamida respectivamente, en la última etapa la aldofosfamida sufre degradación espontánea formando la acroelina y mostaza de fosfaramida, con alta actividad citotóxica (**Denman A y Denman D, 1992**). La vida media de la Cf y sus metabolitos en plasma es de 7 horas aproximadamente (**Arndt C et al, 1988**), de manera que para que estos tengan un efecto claro debe de haber proliferación celular en el momento en que estén presentes.

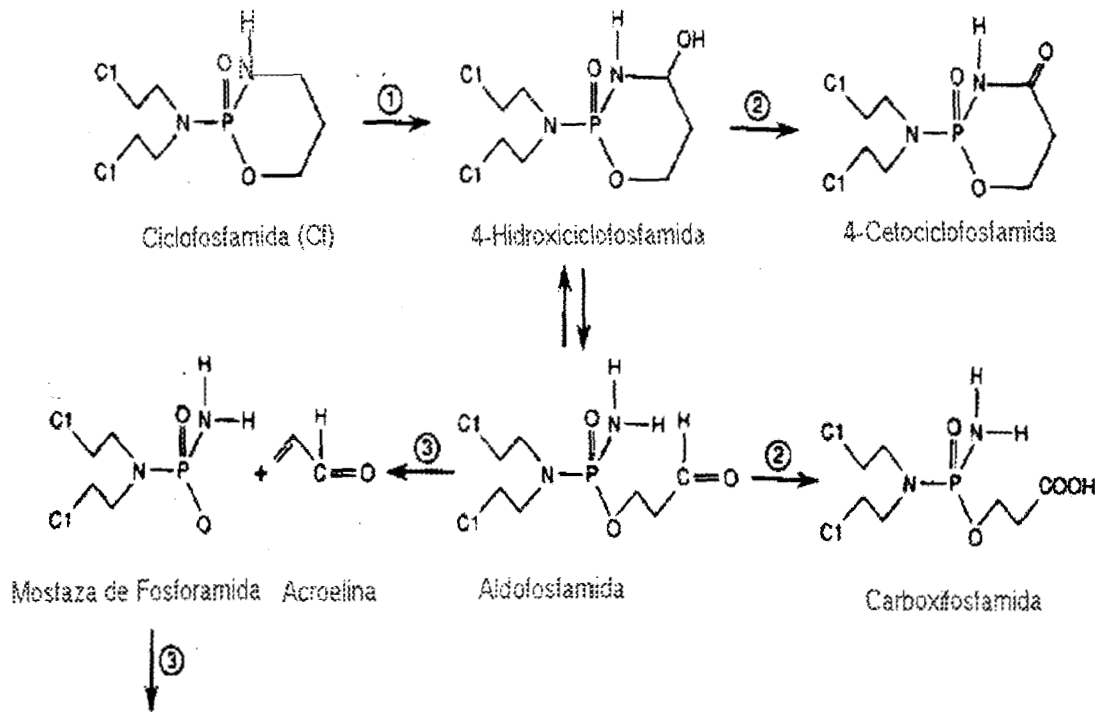


Fig. 2 : Metabolismo de la Cf. 1) Oxidación microsomal por la enzima P-450 ; 2) aldehído deshidrogenasa ; 3) degradación espontánea.

Efectos Inmunológicos

En términos generales los agentes alquilantes modifican la respuesta inmune mediante su capacidad antiproliferativa afectando células inmunocomponentes como linfocitos y células accesorias. En humanos la respuesta primaria de anticuerpos es sensible al fármaco, pero una respuesta establecida es relativamente resistente.

En modelos animales la administración de dosis bajas de Cf, parece tener un efecto antiproliferativo sobre células "supresoras" (Denman A y Denman D, 1992), pero también es posible que el fármaco afecte la producción de citocinas, ya que estas influyen en la magnitud y duración de la respuesta inmune (Sewell W et al, 1987).

Existen pocos trabajos en los que se ha evaluado el efecto de la Cf sobre el desarrollo de infecciones por parásitos, al respecto ratones Balb/c tratados con Cf (200 mg/kg de peso) 48 hr.

previas a la infección con *T. crassiceps*, desarrollaron resistencia contra el parásito, este fenómeno estuvo en estrecha relación con la potenciación de la DTH, ya que los ratones no tratados fueron susceptibles a la infección aunque produjeron altos títulos de anticuerpos específicos contra el parásito (Bojalil R et al, 1993), lo anterior sugiere que el fármaco puede modificar la susceptibilidad a la infección.

IV) Justificación

Las vacunas desarrolladas en la actualidad confieren resistencia solo en contra de algunos patógenos (**Arala-Chaves M, 1992**), pero aún no se ha podido proteger contra la gran mayoría de agentes infecciosos, en este caso se incluyen parásitos como *Trypanosoma cruzi* (**Cuneo C y Molina de Raspi E, 1989**) y *Taenia crassiceps* (**Sciutto E, 1990**) y contra los cuales solo se ha inducido una protección relativa que probablemente sea consecuencia del establecimiento de una respuesta inmune inadecuada.

Una estrategia alternativa para modificar esta respuesta es mediante la utilización de fármacos inmunomoduladores, por lo que consideramos importante determinar el efecto de la ciclofosfamida que posiblemente potencia una respuesta tipo Th1, en un modelo murino susceptible a *T. cruzi*, y de esta manera modificar el patrón de producción de citocinas y la susceptibilidad en contra del parásito.

V) Objetivo general

- Evaluar el efecto de la Cf sobre el desarrollo de la parasitemia por *T.cruzi* y el daño tisular en ratones Balb/c .

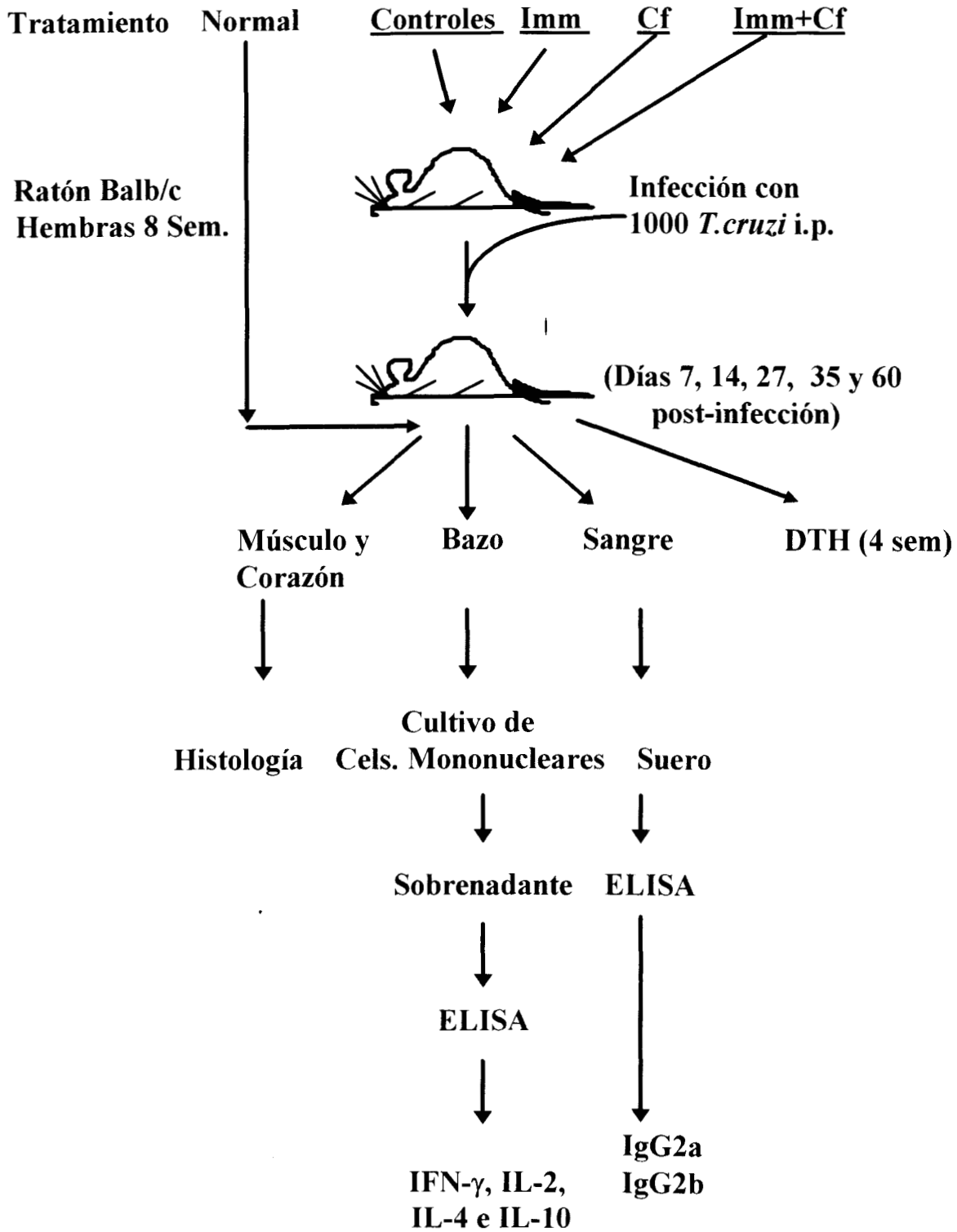
Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de extractos antigénicos de *T.cruzi* administrados previamente a la infección con el parásito y las modificaciones a dicho efecto inducidos por la Cf.
- Definir el perfil de citocinas producido por organismos pretratados e infectados con *T.cruzi*.
- Explorar si existe correlación entre el grado de parasitemia, el patrón de producción de citocinas y el daño tisular.

Hipótesis

“La Cf favorece la producción de citocinas tipo Th1, por lo que modificará la susceptibilidad de los ratones Balb/c infectados con *T.cruzi*”

Metodología



VI) Metodología

Animales : El modelo se realizó en ratones Balb/c hembras con una edad de entre 8-12 semanas, que fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC).

Parásitos : Los animales se infectaron con tripomastigotes procíclicos de *T. cruzi* de la cepa Ninoa mantenidos por pases sucesivos en ratones Balb/c y proporcionados por el Dr. Victor Monteon Padilla del INC.

Tratamientos : Los animales fueron divididos en cinco grupos :

1) Ratones tratados con antígeno (**Imm**), constituido por un extracto total de *T. cruzi* en fase epimastigote crecidos en un medio de infusión de hígado-triptosa (**LIT**).

Los parásitos fueron sonicados a 400 watts con 8 pulsos de 10 segundos en un sonicador Laser sonic Mod. 1510, la muestra fue centrifugada a 3000 rpm (centrífuga refrigerada Sorvall RT 6000) y el medio decantado, en seguida el botón de parásitos fue resuspendido en 1 ml de PBS con un pH=7.4. La concentración de proteínas totales presentes en el extracto fue cuantificada mediante la técnica de Lowry (**Lowry OH, 1951**). Los ratones fueron vacunados intraperitonealmente 5 días antes de la infección con una sola dosis de 100 µg de proteína diluida en 100 µl de solución salina estéril.

2) Ratones tratados con **Cf** 200 mg/Kg (Sigma) vía intraperitoneal 48 hr previas a la infección.

3) Animales tratados con el antígeno 5 días antes de la administración de la Cf (**Imm+Cf**).

Infección : Esta se realizó inyectando 1000 tripomastigotes procíclicos en 100 µl de solución salina estéril vía i.p.

4) Control positivo, al cual solamente se le inocularon los parásitos.

5) Control negativo (ratones normales).

Cinética de la parasitemia

Durante diferentes tiempos postinfección (7, 14, 27, 35 y 60 días) se utilizaron 5 ratones por grupo, durante 3 experimentos independientes (n=15), se contó el número de parásitos en sangre periférica tomando 5 μ l de sangre de la cola de cada animal, la sangre se colocó en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos de 18X18 mm. Las muestras se observaron al microscopio óptico (Leitz, Modelo Rialux a 250 aumentos) y se revisó toda el área del cubreobjetos; de manera que para calcular el número de parásitos/ml de sangre se maneja la siguiente regla :

X parásitos hay en 5 μ l , Y parásitos hay en 1000 μ l= el número de parásitos se reportó por ml de sangre.

Procesamiento de la sangre

Además el día de sacrificio correspondiente al programa, a los ratones se les extrajo sangre del plexo ocular, la cual se dejó coagular en un tubo de ensaye, en seguida el coágulo se despegó de las paredes del tubo y la muestra se centrifugó a 3000 r.p.m. (centrifuga refrigerada Sorvall RT 6000), inmediatamente después se obtuvo el suero que se almacenó a -20° C hasta su uso.

Sacrificio, obtención de órganos y procesamiento para el estudio patológico

Los ratones fueron sacrificados en los días 9, 14, 27, 35 y 60 postinfección mediante dislocación cervical y se disectaron para obtener bazo, músculo esquelético y corazón.

Tanto el músculo esquelético como el corazón fueron fijados en formol al 10% en PBS. Estos tejidos se procesaron por la técnica de hematoxilina-eosina que brevemente consiste en deshidratar las muestras con su posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes de

aproximadamente 6 μm de grosor en el microtomo, que se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (de etanol absoluto a etanol al 60% y PBS) y se tiñeron con hematoxilina y posteriormente eosina. Finalmente se montaron en resina para su observación.

Cultivos celulares

Los bazo de los ratones se manejaron bajo condiciones de esterilidad en una campana de control biológico (VECO). Las células se extrajeron mediante perfusión del órgano con solución salina de Hanks estéril (IN VITRO). Estas células se contaron en una cámara de Neubauer y se sembraron 5 millones de células/ml de RPMI 1640 (IN VITRO) suplementado (10% de suero fetal bovino inactivado (IN VITRO), 1% de aminoácidos no esenciales (in vitro), 1% de buffer de HEPES 1M (IN VITRO) y 1% de penicilina-estreptomicina (IN VITRO) por pozo, en placas de cultivo de 24 pozos (COSTAR).

Estas células se estimularon con 2 μg de Concavalina A tipo V (SIGMA)/ ml de RPMI suplementado. Las células se incubaron durante 48 hr a 37°C, con 5% de CO₂ y 19.7% de humedad en una incubadora de CO₂ automática (FORMA SCIENTIFIC).

Después de este período los sobrenadantes se cosecharon en viales estériles, centrifugando el contenido de cada uno de los pozos de la placa de cultivo a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y posteriormente se almacenaron a -70°C en un ultracongelador (NUAIRE) de -85°C.

Cuantificación de citocinas

Las citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 fueron determinadas a partir de los sobrenadantes mediante la técnica de ELISA en "sandwich", que brevemente consistió en sensibilizar una microplaca con alta capacidad de unión para E.I.A./R.I.A. (COSTAR) con 100 μl de anticuerpo de captura correspondiente (PHARMINGEN) previamente diluido en un buffer de Bicarbonato de Sodio

0.1M y pH 8.2 en una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$, la placa se incubó a 4°C durante toda una noche. Después de este período se lavó 2 veces con una solución PBS/Tween 20. A continuación la placa se bloqueó con 200 μl de una solución de PBS/ albúmina sérica bovina (ICN BIOMEDICALS) al 3% (BSA) durante 2 hrs a temperatura ambiente ; posteriormente la placa se lavó 2 veces con PBS/Tween. En la siguiente etapa se colocaron 100 μl por pozo de la curva patrón con citocina recombinante (PHARMINGEN), cubriendo el rango de concentraciones de 15- 2000 pg/ml, y de los sobrenadantes diluidos 1 :2 en PBS/BSA al 3%, estos se dejaron incubar a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente la placa se lavó 4 veces con PBS/Tween y se colocaron 100 μl de la anticitocina biotinilada (Pharmingen) correspondiente en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS/BSA al 3% y se dejó incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente ; enseguida la placa se lavó 6 veces y se agregaron 100 μl por pozo de estreptoavidina peroxidasa (AMERSHAM LIFE SCIENCE) a partir de una dilución 1 :1500 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos ; después se lavó 8 veces con PBS/Tween y por último se colocaron 100 μl por pozo de una solución de ABTS (ZYMED), la placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se leyó a 405 nm. en un lector de microplacas (METERTECH MOD. Σ 960).

Determinación de la DTH

La DTH se evaluó en todos los grupos de ratones mediante la inyección de 10 μl de solución salina conteniendo 5 μg de proteína del extracto del parásito, la administración se realizó con una jeringa Hamilton en el cojinete plantar de la pata izquierda, en la pata derecha se inyectaron solamente 10 μl de solución salina, 24 hr después se midió la inflamación de la zona con un Verniere y se calculó la diferencia de inflamación del cojinete en mm., esta parte del estudio se realizó con 3 ratones y las mediciones fueron durante las primeras cuatro semanas.

Determinación de subclases de anticuerpos

Una placa de 96 pozos fue incubada con 100 μ l de un stock de antígeno de *T. cruzi* con una concentración de 5 μ g/ml en tris pH 7.8 durante 12 hrs. y a 4 ° C. Al día siguiente la placa se lavó 5 veces con PBS/Tween al 0.15 % y los sueros a probar se diluyeron 1 :100 en PBS/Tween al 0.15%+ 1% de BSA., se dejó incubar por 1 hr. a 37 ° C y se lavó 5 veces con PBS/Tween al 0.15%. Se colocaron 100 μ l de los anticuerpos anti-IgG2a o anti-IgG2b (marca ZYMED) previamente diluidos 1 :1500 en PBS/Tween al 0.15% y se incubaron durante 1 hr. a temperatura ambiente ; posteriormente la placa se lavó 5 veces con PBS/Tween al 0.15% y por último se colocaron 100 μ l de una solución de Dietanolamina al 10% + sustrato para fosfatasa de SIGMA(10 mg/10 ml de solución) , la reacción se dejó correr durante 15 min. y posteriormente se detuvo con 100 μ l de una solución de NaOH 2N. Las placas se leyeron a 450 nm. en un lector de microplacas (METERTECH MOD. Σ 960).

Análisis estadístico

El análisis se realizó en el paquete estadístico SPSS, aplicando una prueba no paramétrica como la U de Mann-Witney , considerando diferencias significativas cuando la $p < 0.05$.

VII) Resultados

Cinética de la parasitemia

Una pregunta fundamental para el estudio fue si los diferentes tratamientos podían modificar la parasitemia, para evaluar el desarrollo de esta se utilizaron 5 ratones por grupo experimental y la cinética se repitió 3 veces de manera independiente. La presencia de parásitos de la cepa Ninoa de *T. cruzi* en circulación se observó a partir del día 9 post-infección (dato no presentado) y aumentó de forma logarítmica hasta el día 27 (**Fig. 3**), el promedio de parásitos en circulación en este punto fue de 410,571 parásitos/ml de sangre y disminuyó gradualmente hasta el día 60. Los animales tratados con Imm mostraron una disminución no significativa de la parasitemia en el día pico (**Fig.3**); mientras que aquellos que recibieron Cf presentaron un aumento significativo del 54% ($p < 0.05$) el día 27 de infección, el resultado fue totalmente opuesto cuando se inyectó el Ag antes que el fármaco (Imm+Cf) ya que se detectó una disminución significativa de la parasitemia ($p < 0.05$), además de retrasar una semana el día pico (**Fig.3**).

Producción de Citocinas

En la siguiente etapa de este estudio se determinaron los niveles de citocinas, las diferencias individuales en su producción, el patrón de estas y su posible influencia sobre el desarrollo de la infección. La producción basal de citocinas antes de inocular el parásito, mostró un patrón constituido por IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 en los ratones normales, al tratar los animales con Imm destacó un ligero aumento de IL-2 e IL-4; por su parte la Cf favoreció significativamente la producción de IL-2 ($p < 0.05$) y disminuyó la IL-10, mientras que en el tratamiento combinado (Imm+Cf) sólo se detectó IFN- γ en niveles similares a los animales sin tratar(**Fig.4**).

Cinética de la parasitemia de T.cruzi

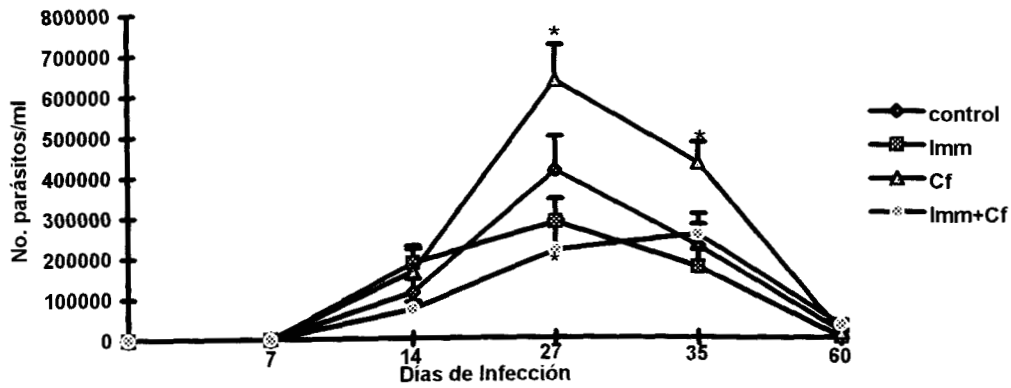


Fig. 3 : Cinética de la Parasitemia en ratones no tratados y tratados utilizando para ello una n=15 por grupo y las barras representan el EE (error estandar).
*p<0.05

Producción de citocinas en ratones tratados sin infección

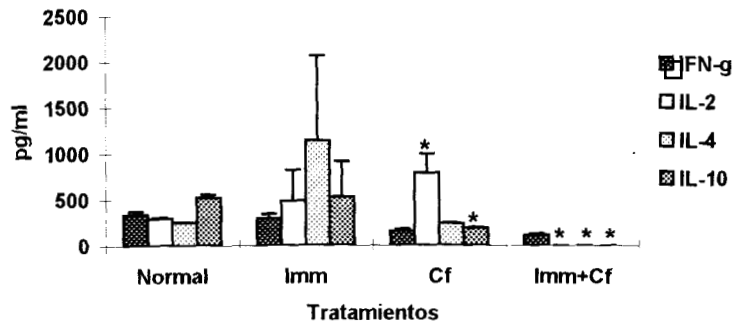


Figura 4: Producción basal de citocinas inducida por los distintos tratamientos. La n=3 y las barras representan la DE.
*p<0.05

Después de infectar con el parásito también se observaron modificaciones, la producción de IFN- γ aumentó gradualmente en todos los grupos (Fig. 5), sin embargo el análisis individual reveló que la Cf no potenció la producción de esta citocina y por el contrario sus niveles se mantuvieron debajo de los detectados en animales con otros tratamientos, aunque para el día 60 aumentaron. El tratamiento con Imm sí favoreció un incremento de esta citocina los días 14 y 35 ($p < 0.05$) y

contrastaron con los niveles considerablemente bajos medidos los días 14 y 27 ($p < 0.05$) en los animales manejados con Imm+Cf, aunque para el día 35 el IFN- γ aumentó significativamente ($p < 0.05$) (Fig.5).

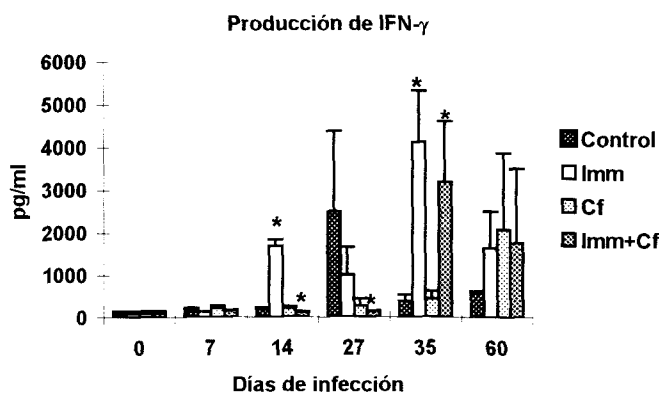


Figura 5 : Producción de IFN- γ en ratones con diferentes tratamientos. La n=4 y las barras representan la DE. El día 0 representa los niveles de ratones normales
* $p < 0.05$

Los niveles de IL-2 (Fig. 6) disminuyeron gradualmente hasta el día 27 en animales solo infectados (no significativo) y posteriormente se recuperaron, el grupo Imm mostró una baja producción de esta citocina al inicio de la infección y posteriormente aumentó, al grado que para el día 35 este incremento fue significativo ($p < 0.05$) ; por su parte la Cf indujo una cinética parecida al grupo control, aunque los niveles de este factor fueron los más bajos justo el día pico y coincidió con el aumento significativo de parásitos circulantes. En el tratamiento combinado (Imm+Cf) la IL-2, pero la producción se recuperó en muy corto tiempo(Fig.6).

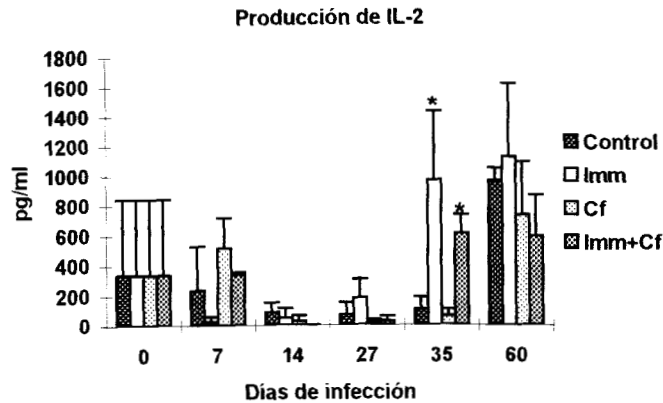


Figura 6: Producción de IL-2 en ratones con diferentes tratamientos. La n=4 y las barras representan la DE. El día 0 representa los niveles de ratones normales
*p<0.05

En el grupo control prácticamente no se detectó IL-4 y en los animales tratados solo con el fármaco se observó incrementada la primera y novena semana de estudio, en esta última la citocina se encontró significativamente elevada ($p<0.05$). Al parecer el tratamiento con antígeno favoreció la producción de este factor ya que en el grupo Imm se detectó aumentado desde la segunda semana de estudio y fue significativo los días 14, 35 y 60; mientras que el tratamiento Imm+Cf se observó un incremento desde el día 27 y fue significativo los días 35 y 60 ($p<0.05$) (Fig.7).

En cuanto a la IL-10, su producción fue constante en el grupo control y solamente en la segunda semana del estudio se detectó substancialmente elevada con respecto a los grupos tratados. Los tratamientos Cf e Imm+Cf indujeron una producción baja pero constante de esta citocina, además en el primero de los casos se encontró significativamente elevada el día 35 con respecto al grupo control. En los animales tratados con Imm aparentemente también se favoreció la producción de esta citocina a partir del día 14 ($p<0.05$) y el aumento fue significativo el día 35 ($p<0.05$) (Fig.8).

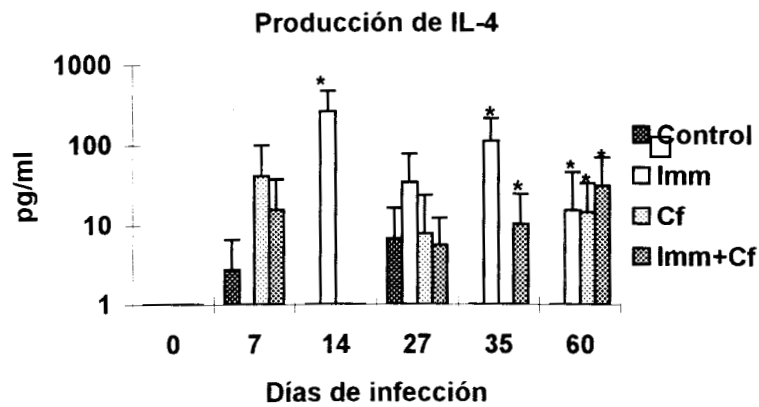


Figura 7 : Producción de IL-4 en ratones con diferentes tratamientos. La n=4 y las barras representan la DE. El día 0 representa los niveles de ratones normales. *p<0.05

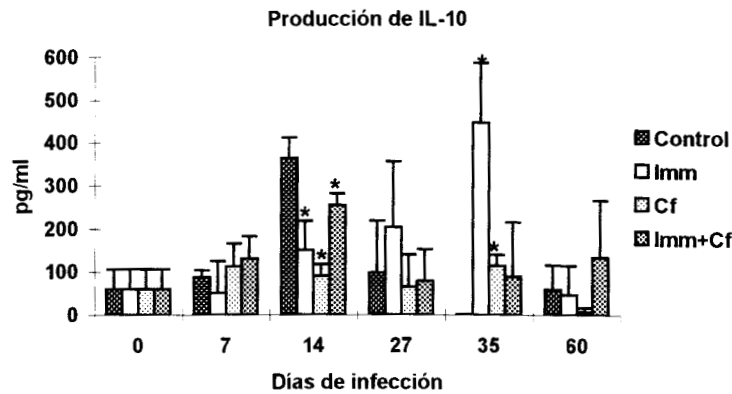


Figura 8 : Producción de IL-10 en ratones con diferentes tratamientos. La n=4 y las barras representan la DE. El día 0 representa los niveles de ratones normales. *p<0.05

Como balance Th1/Th2, en general se observó que a partir de la primera semana de infección la respuesta fue mixta considerando los niveles de IFN- γ , IL-2 e IL-10; este patrón se mantuvo hasta el día 14 y para el día 27 la producción de IFN- γ aumentó claramente, mientras que IL-2 e IL-10 permanecieron en concentraciones similares el día 27 y en el 35 se pudo observar un dominio tipo Th1 (Fig. 9).

Producción de citocinas en ratones parasitados con *T. cruzi*

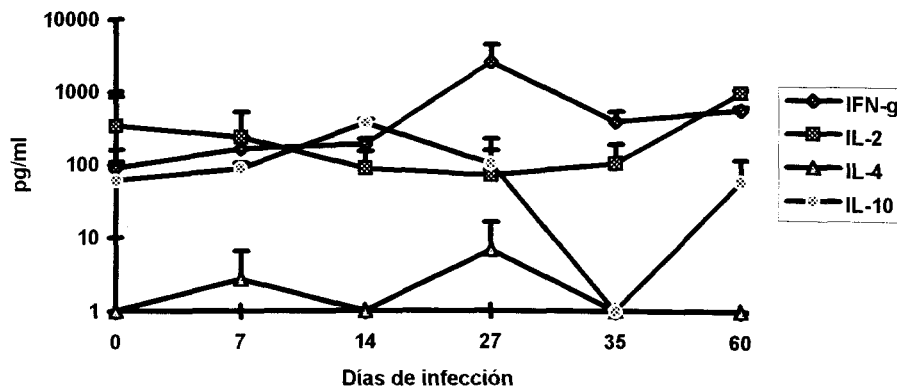


Figura 9: Producción de Citocinas en ratones parasitados. La n=4 y las barras representan la DE. El día 0 representa los niveles de ratones normales

En ratones tratados con Imm, la producción de IFN- γ se mantuvo por arriba de las demás citocinas durante los 60 días de estudio, pero IL-2 e IL-10 se produjeron en concentraciones similares hasta el día 35 de infección, la IL-4 se detectó en concentraciones similares a la IL-2 e IL-10 el día 14 y posteriormente se mantuvo constante. Para el día 60 este grupo mostró una producción de citocinas tipo Th1 dominante. (Fig. 10).

Los animales con Cf mostraron una respuesta mixta dependiente de IFN- γ e IL-10 solo la primer semana, el resto del estudio los niveles de IFN- γ se mostraron por arriba de las demás citocinas, la IL-10 se produjo constante pero en niveles por debajo del IFN- γ . Durante los días 14 y 35 la IL-10 e IL-2 se detectaron en concentraciones similares, sin embargo esta última disminuyó considerablemente el día 27 ; por último la IL-4 se mantuvo intermitente y en bajas concentraciones. En el día 60 en este grupo también se observó un patrón tipo Th1 dominante (Fig.11).

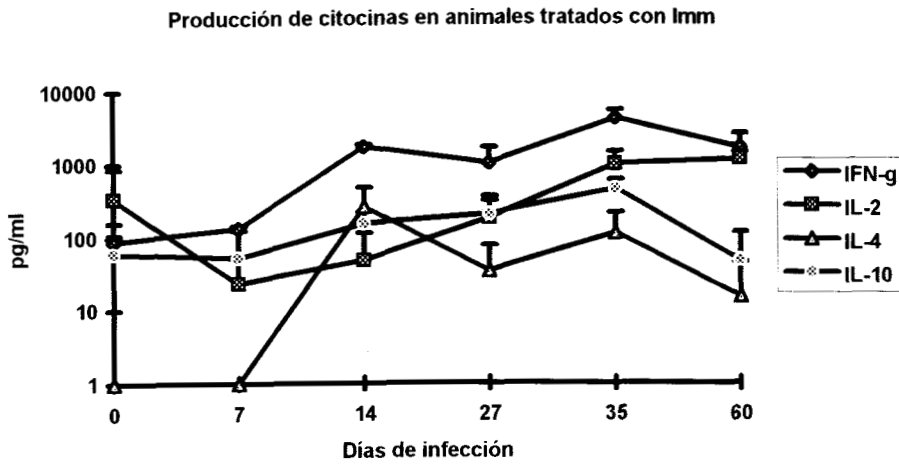


Figura 10: Producción de Citocinas en ratones tratados con Imm. La n=4 y las barras representan la DE. El día 0 representa los niveles de ratones normales

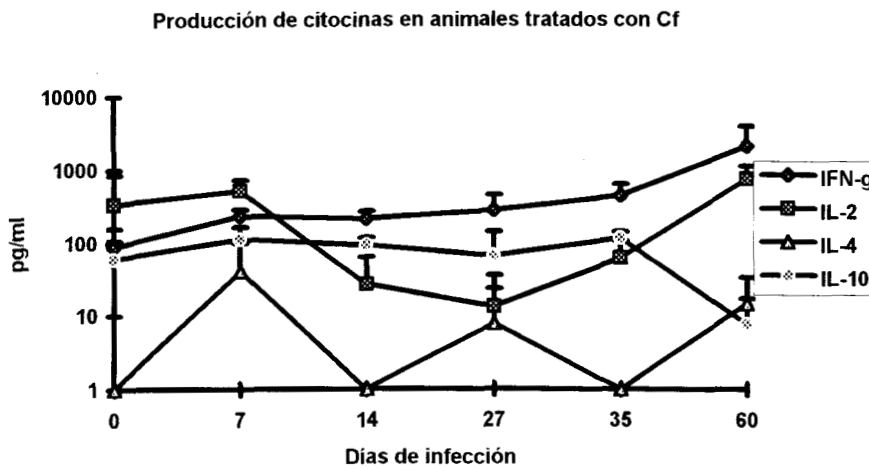


Figura 11: Producción de Citocinas en ratones tratados con Cf. La n=4 y las barras representan la DE. El día 0 representa los niveles de ratones normales

En el caso de Imm+Cf, la producción de IFN- γ e IL-10 fue mixta hasta el día 27, a partir de este momento el IFN- γ se incrementó e IL-10 se mantuvo constante hasta el día 60. Los niveles de IL-2 e IL-4 disminuyeron el día 14 y posteriormente se recuperaron de forma gradual. En este grupo no se observó un dominio de algún tipo de citocinas e inclusive se produjeron concentraciones similares a partir de la cuarta semana del estudio (Fig. 12).

225715

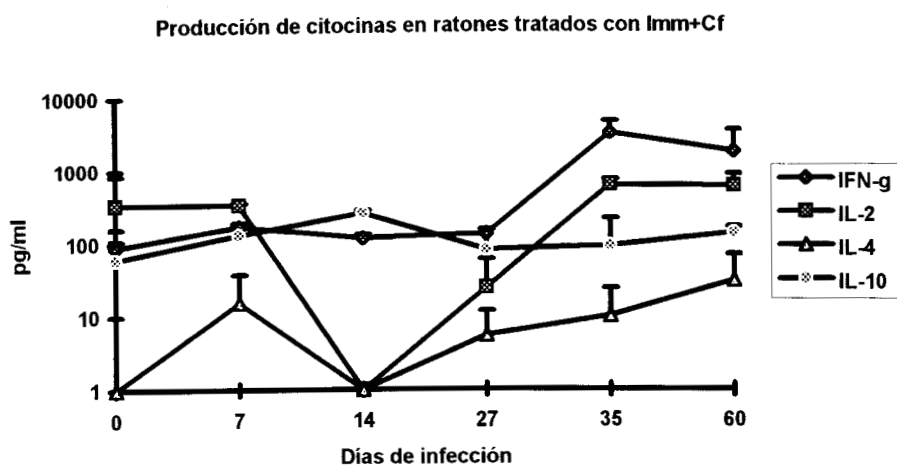


Figura 12: Producción de Citocinas en ratones tratados con Imm+Cf. La n=4 y las barras representan la DE. El día 0 representa los niveles de ratones normales

Respuestas inmune celular y humoral

Con la finalidad de determinar que eventos inmunológicos fueron favorecidos por los tratamientos en primer lugar se midió la DTH (inmunidad celular que es potenciada por Th1), esta se observó elevada en los grupos Cf e Imm+Cf durante la primera semana de estudio, pero no fue significativamente diferente a la observada en los grupos Imm y control. La DTH disminuyó gradualmente y para la cuarta semana fue similar a la de animales normales (**Fig. 13**).

Los niveles de las subclases de anticuerpos IgG2a (favorecida por Th1) e IgG2b (mediada por Th2) también fueron medidos. La producción de IgG2a fue clara y en concentraciones similares entre los grupos el día 35, pero para el día 60 fue mayor ($p < 0.05$) en los animales infectados y sin tratar (**Fig. 14**). Cabe señalar que el grupo tratado con Imm+Cf mostró una mayor producción de esta inmunoglobulina el día 27, pero los niveles detectados el día 60 fueron los más bajos ($p < 0.05$) (**Fig.14**).

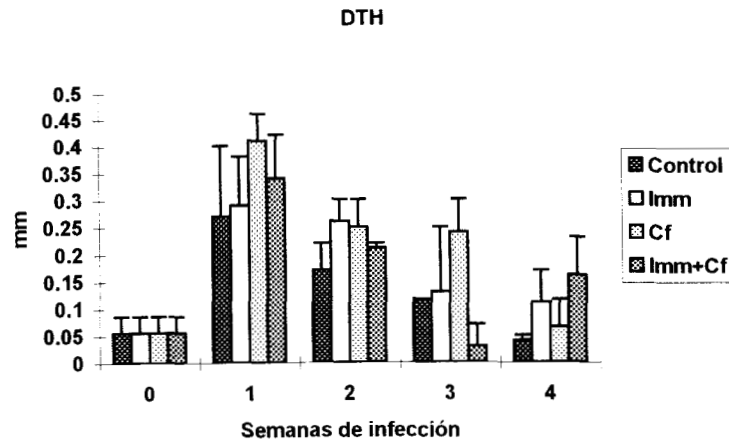


Figura 13 : Respuesta de hipersensibilidad retardada probada con una n=3 y las barras representan la DE. El día 0 representa la DTH de animales normales

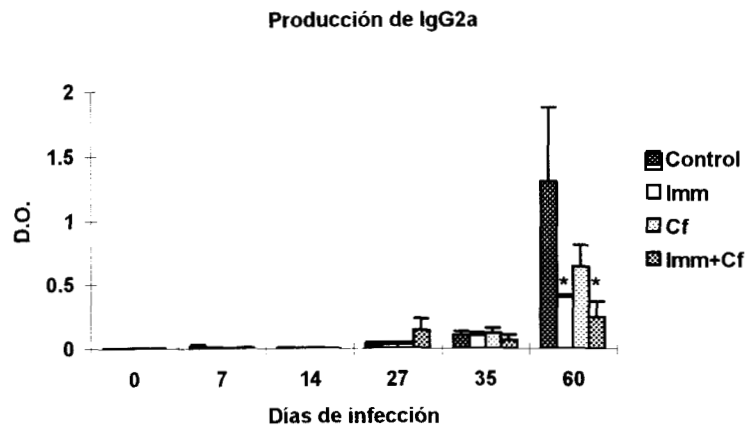


Figura 14 : Producción de anticuerpos de la subclase IgG2a. La determinación se realizó con una n=3 y las barras representan la DE. *p<0.05

Por otro lado se observó que en general la producción de IgG2b se inició a partir del día 27, pero los animales tratados con Imm+Cf, los cuales produjeron los niveles mayores de esta subclase de anticuerpo (Fig.15).

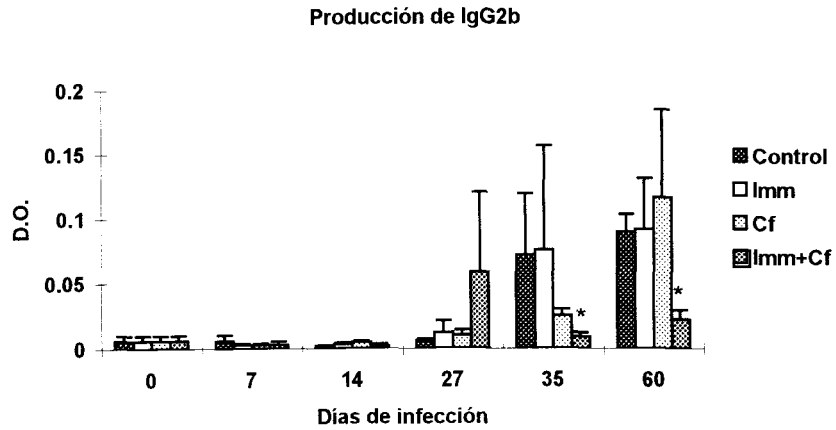


Fig.15. Producción de la subclase IgG2b de anticuerpos. La determinación se realizó con una n=3 y las barras representan la DE.
*p<0.05

Debido a que el tratamiento Imm+Cf favoreció el aumento de la IgG2b se analizaron los niveles de este anticuerpo con respecto a la IgG2a y se observó que el día 27 los niveles fueron similares (Fig.16).

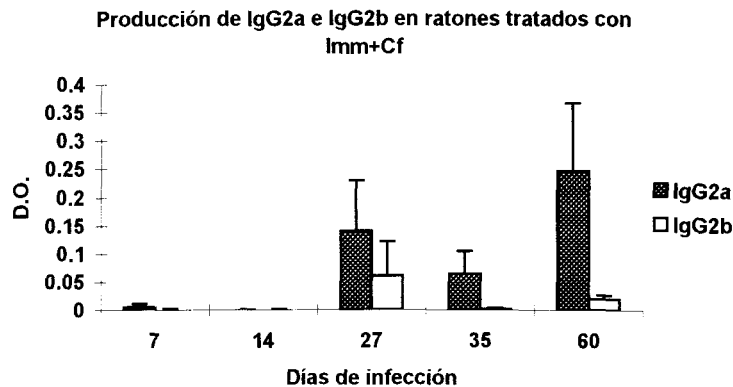


Fig.16 Producción de anticuerpos en el grupo tratado con Imm+Cf. La determinación se realizó con una n=3 y las barras representan la DE.

Daño Tisular

El daño en tejidos se evaluó considerando independientemente el grado de infiltrados celulares y de necrosis tisular en el músculo (Figs. 17-19) y el corazón (Figs.20-21). Se asignó la categoría de daño leve (+) cuando las lesiones se encontraron hasta en el 10% de las áreas analizadas, moderado (++) que representó hasta el 20% de daño y severo (+++) más del 30%.



Fig. 17. Corte histológico del músculo esquelético de ratón normal en el que se observa una distribución normal de fibras musculares (FM). Técnica HE. Aumento original de 44.75X.



Fig. 18. Corte histológico del músculo esquelético de animales con 27 días de infección con *T. cruzi*, se puede observar abundante infiltrado inflamatorio de células mononucleares (MN) en el intersticio y necrosis parcial (NP) o total (NT) de fibras musculares (FM). Técnica HE. aumento original de 44.75X.

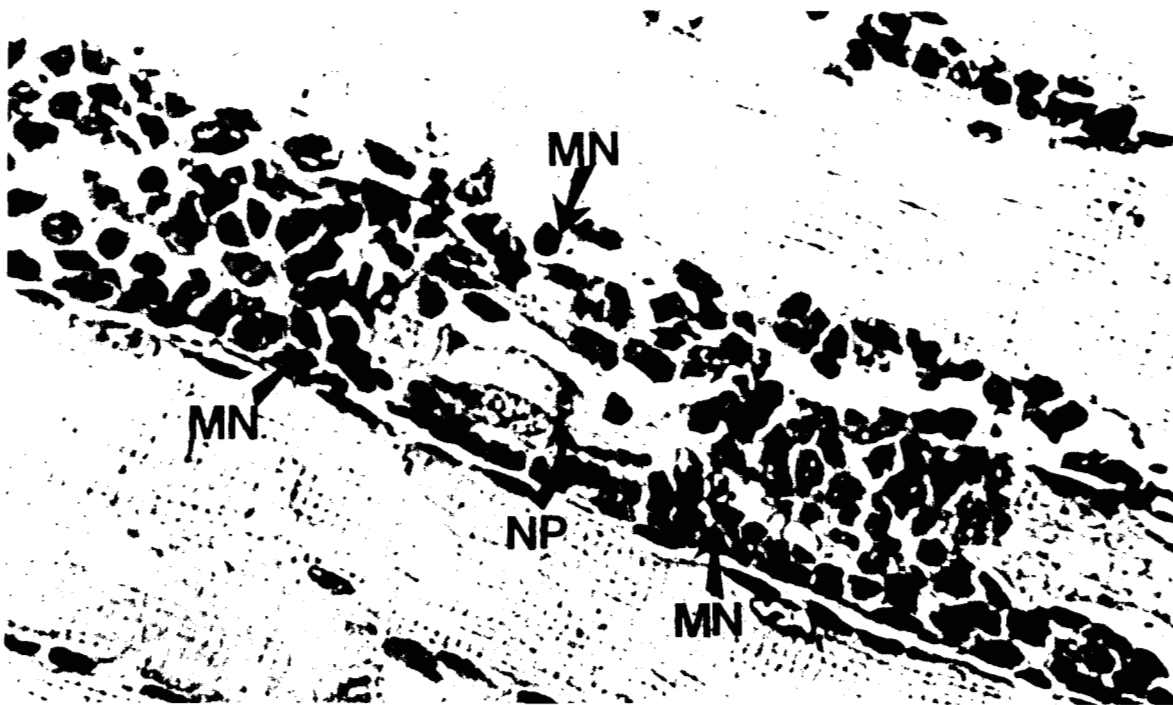


Fig. 19. Corte histológico de músculo esquelético de ratón tratado con Imm+Cf y con 27 días de infección en el que se observa infiltrado de células mononucleares (MN) que rodea una zona de necrosis parcial (NP). Técnica HE. Aumento original de 200X.

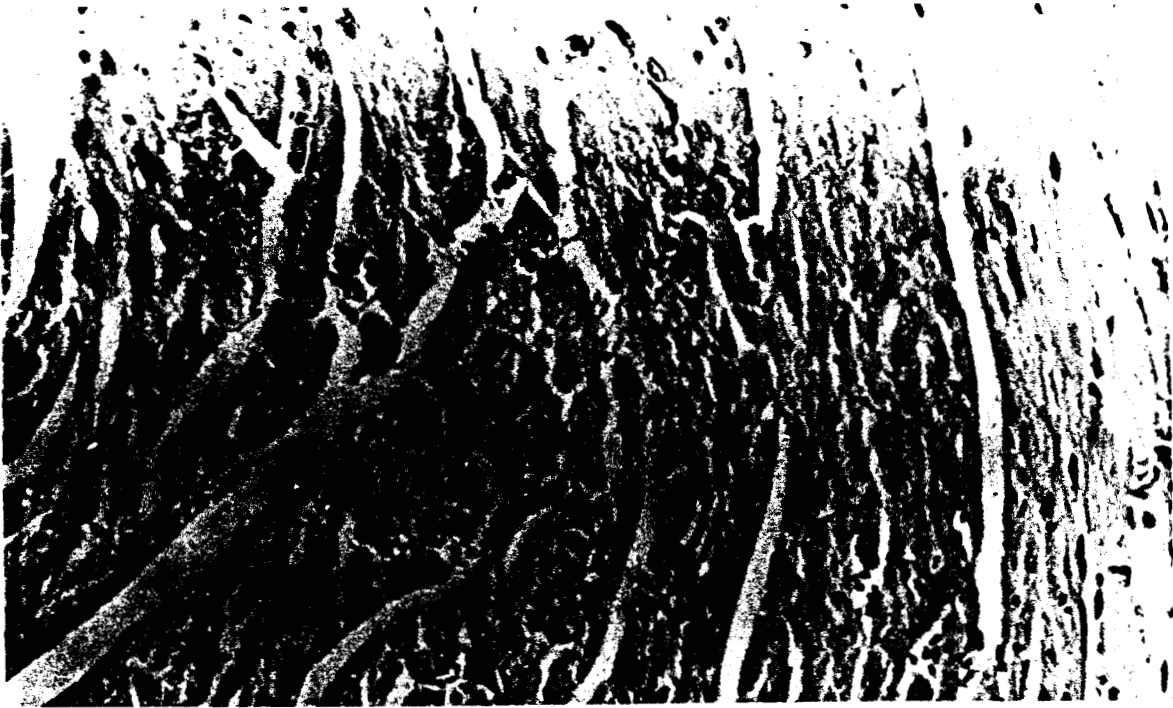


Fig. 20. Corte histológico de músculo cardiaco normal de ratón y en el que se observa una distribución normal de fibras cardiacas (FC) (también se observan algunos artificios del corte). Técnica HE. Aumento original de 44.75X.

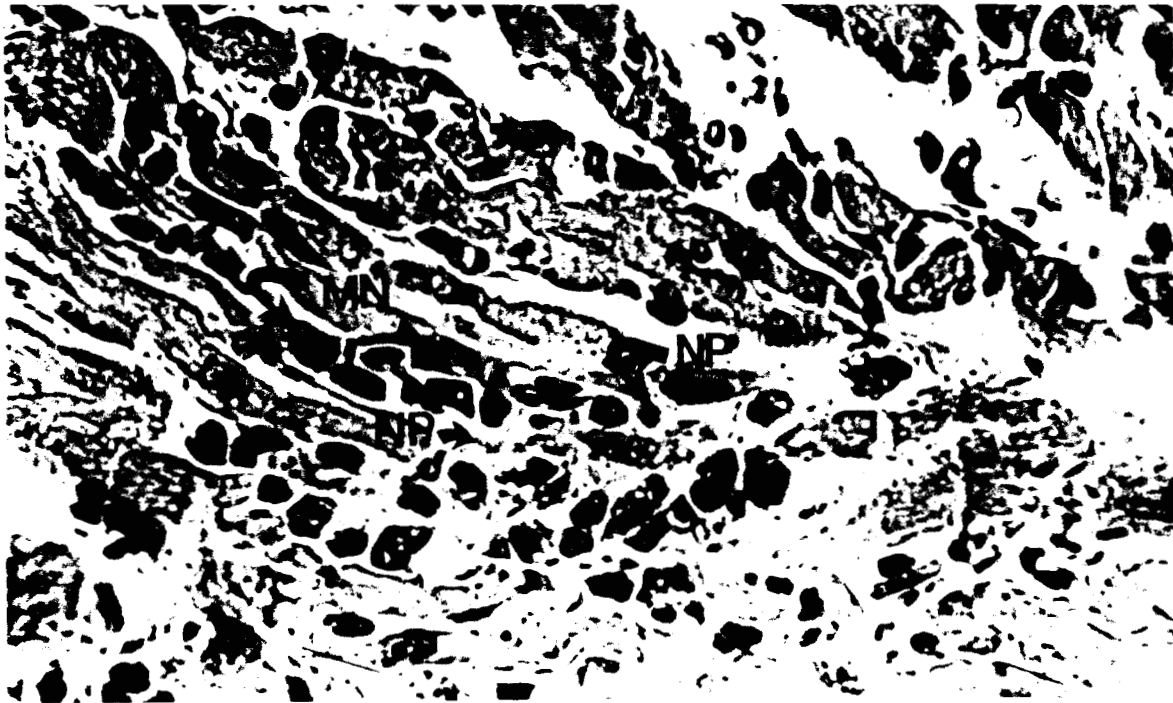


Fig. 21. Corte histológico de músculo cardiaco de animales tratados con Imm+Cf y con 27 días de infección, en el que se observan infiltrados de células mononucleares (MN) en el intersticio y fibras con necrosis parcial (NP). Técnica HE. Aumento original de 500X.

En el día 27 de infección el grado de infiltrados celulares en el músculo fue severo, mientras que los tratados previamente con Cf mostraron una infiltración ligera y los grupos tratados con Imm e Imm+Cf una infiltración moderada ; estos últimos presentaron un grado leve de infiltración el día 60, en contraste el grupo control infectado y el tratado con Cf desarrollaron una infiltración moderada (Fig. 22).

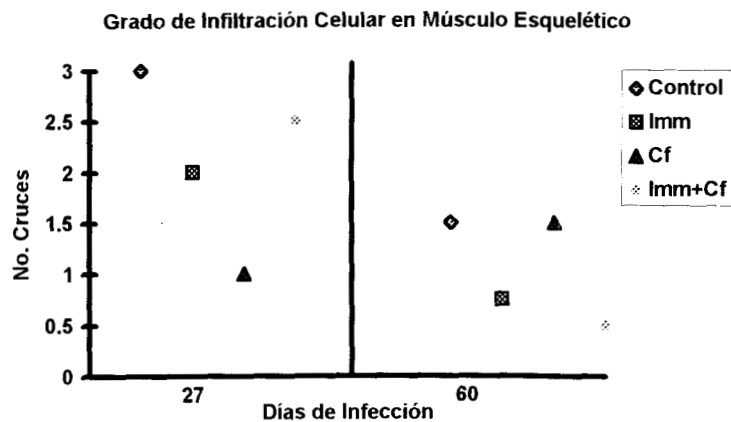


Fig. 22. Daño tisular en ratones con tratamiento o solamente infectados. n=2.
 += Leve, ++= moderado, +++= severo.

En tejido cardíaco se observó un grado moderado de infiltración el día 27 en animales sin tratamiento, lo mismo sucedió en el grupo con Imm+Cf y por el contrario los ratones tratados con Imm y Cf presentaron un grado ligero de infiltración. Para el día 60 el grupo control mostró grado leve de infiltración, esto mismo se observó en ratones con los tratamientos Imm e Imm+Cf y por el contrario los animales con Cf presentaron un daño moderado a este nivel (Fig. 23).

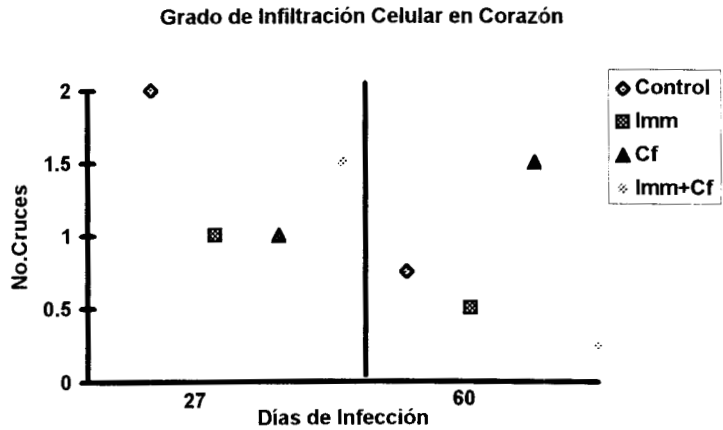


Fig. 23. Daño tisular en ratones con tratamiento o solamente infectados. n=2.
 += Leve, ++= moderado, +++= severo.

A los 27 días de infección, el grado de necrosis muscular fue moderado en los ratones parasitados, ligeramente disminuido en animales tratados con Imm e Imm+Cf e infiltrado leve en ratones del grupo Cf. Un mes después, en los grupos control y Cf se observó un grado leve de necrosis, mientras que los ratones tratados con Imm e Imm+Cf no mostraron necrosis a este nivel (Fig.24).

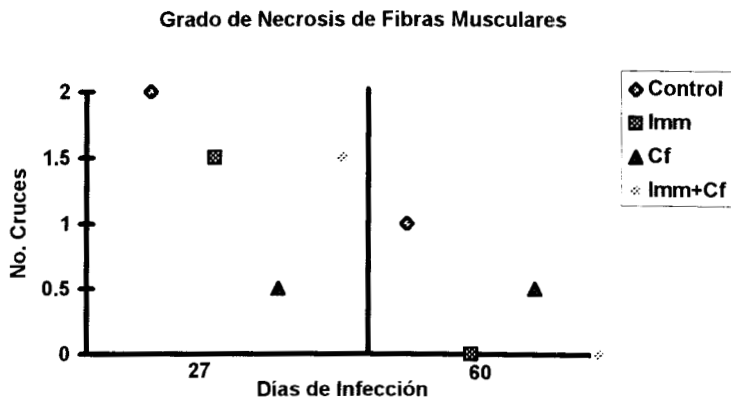


Fig.24. Daño tisular en ratones con tratamiento o solamente infectados. n=2.
 += Leve, ++= moderado, +++= severo.

Por último, en el corazón los ratones parasitados mostraron el día 27 un grado ligero de necrosis, similar a lo encontrado en los tratados con Cf, pero los animales tratados con Imm e Imm+Cf no mostraron daño. Después de 60 días de infección el grado de necrosis disminuyó en ratones sin tratamiento, mientras que en los ratones con Imm, Cf e Imm+Cf no mostraron daño (Fig.25).

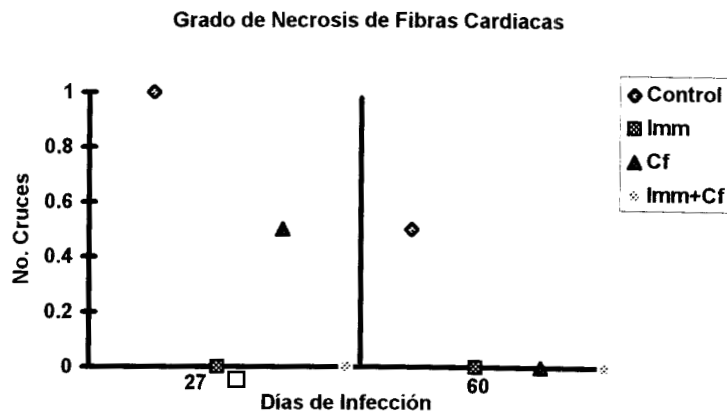


Fig.25. Daño tisular en ratones con tratamiento o solamente infectados. n=2.
 += Leve, ++= moderado, +++= severo.

VIII) Discusión

La cinética de la parasitemia de *T. cruzi* de la cepa Ninoa, se caracteriza por la presencia de parásitos en circulación desde el día 9 de infección, un pico durante la cuarta semana y la caída en el día 60. Los tratamientos previos modificaron el curso de esta infección y los niveles de parásitos con respecto al grupo control ; sin duda el efecto más interesante fue mediado por la Cf, que de manera individual indujo un aumento significativo de la parasitemia (54 %) el día pico ($p < 0.05$), pero cuando el antígeno se administró antes que el fármaco la disminuyó un 38 % ($p < 0.05$) y retrasó una semana su pico.

Estos resultados fueron paradójicos entre sí y llamó la atención el efecto del tratamiento Imm+Cf ya que en general se considera a la Cf como un inmunosupresor. Diversos estudios sugieren que el efecto del fármaco sobre el desarrollo de la infección depende de varios aspectos :

a) La dosis administrada: En un modelo murino, los animales fueron tratados con 200 mg /kg de Cf, 24 hrs antes de la inoculación de *T. cruzi* de la cepa Y por la vía subcutánea, como resultado se observaron parasitemias por arriba de los controles y mortalidades del 100% en muy corto tiempo; pero si la dosis administrada es cinco veces menor, los animales muestran una susceptibilidad similar al grupo control y menor mortalidad (Silva J y Rossi M, 1990). **b) La cronicidad con que se administra:** La aplicación repetida del fármaco durante la fase crónica de la infección, la recrudece (Pereira M et al, 1996) ; pero si se administrara crónicamente desde antes de la infección, su efecto seguramente sería más agresivo ya que los animales desarrollarían inmunosupresión (Rugstand H, 1992) y **c) La relación entre el tiempo de administración del fármaco y la infección :** Una dosis de 200 mg /kg de Cf 48 hrs previas a la infección con la cepa Y del parásito, indujo miocarditis la cual se asoció con la proliferación del parásito ; si la misma dosis se administra 5 días posteriores

a la infección, también se observa proliferación de parásitos pero no se asocia con inflamación del miocardio (Calabrese K et al, 1996).

Lo anterior sugiere que el efecto inmunosupresor del fármaco facilita la proliferación parasitaria y que el desarrollo de la infección depende en gran medida de la dosis con que se traten los animales y el momento en que estos son infectados.

En contraposición Thomson (1987) reportó que al administrar 150 mg/kg de Cf a ratas que posteriormente fueron retadas con ovoalbúmina en adyuvante completo de Freund, favoreció el aumento de poblaciones de células Th y macrófagos en el bazo, mientras que la población de linfocitos B fue abatida. Lo anterior permite pensar que el fármaco administrado antes de iniciar una RI puede establecer condiciones basales favorables para un buen desarrollo inmunológico, pero su administración una vez iniciada puede modificar los resultados.

En otro renglón, se ha reportado que la administración de un extracto antigénico de *T. cruzi* fue capaz de inducir una resistencia relativa contra la infección (Camargo I et al, 1991); esto fue confirmado por los resultados del presente estudio ya que el tratamiento Imm disminuyó el grado de parasitemia, pero este no fue significativo.

Se pensó que los fenómenos inmunológicos que desarrollaron los animales influyeron sobre los resultados; para corroborar esto se midieron citocinas de animales tratados sin infectar y durante la infección. En este contexto la Cf potenció la producción de IL-2 ($P < 0.05$), mientras que el Imm aumentó ligeramente la de IL-4, estos resultados sugieren que el fármaco potenció ligeramente una respuesta tipo Th1, mientras que el Imm aunque menos claro la tipo Th2 (Fig.25); sin embargo es complicado explicar como es que respuestas diferentes al combinarse (Imm+Cf) fueron apagadas.

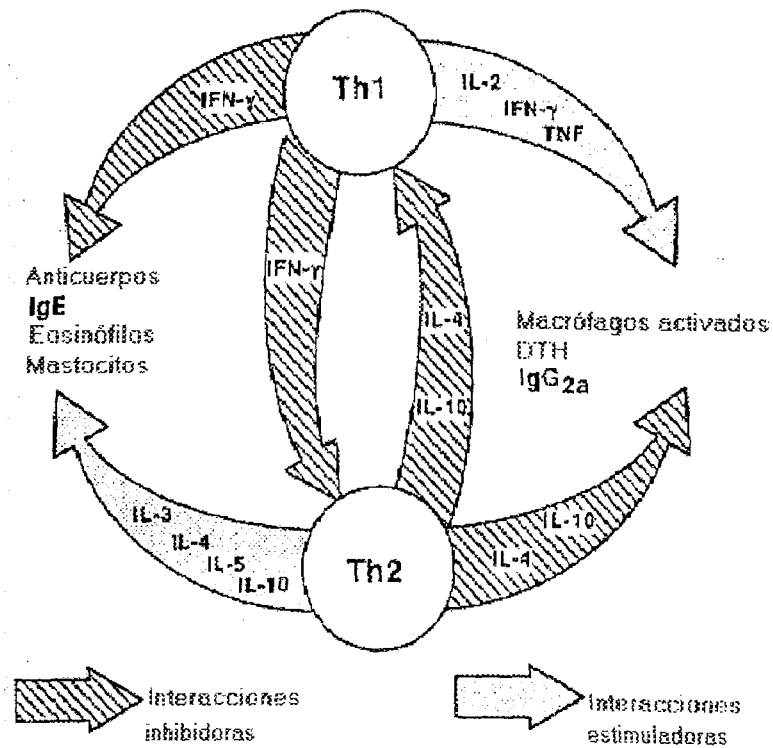


Fig. 25. Se observa las citocinas producidas por las poblaciones Th1 y Th2 de linfocitos y los eventos que se estimulan o se inhiben.

El análisis de los eventos de manera secuencial podría proporcionar información al respecto, en este sentido al administrar el Imm se produjeron citocinas de ambos tipos como resultado del estímulo antigénico, probablemente se indujo proliferación celular de las dos subpoblaciones y al administrar la Cf ambas fueron dañadas, de esta manera se abatió la producción de citocinas con excepción de IFN- γ . Esto es factible si se considera que otra fuente de esta citocina la constituyen células NK, las cuales son resistentes al efecto citotóxico del fármaco (Thomson A et al, 1987). Esta condición parece conferirle ventajas al grupo Imm+Cf ya que antes de infectar está presente y no se observaron citocinas antagónicas. Estos resultados son concordantes con otros recientes en los que se ha probado que la presencia de IFN- γ en etapas iniciales de la infección protege contra el parásito (Cardillo F et al, 1996)

Tal como lo mencionó Tarleton (1991), los niveles de IFN- γ se incrementaron una vez que los animales fueron infectados con *T.cruzi*, pero parece que no influyen sobre el desarrollo de la fase aguda de la infección. Lo anterior fue corroborado en el presente estudio, se observó que los grupos Imm e Imm+Cf en algunos momentos mostraron niveles significativamente diferentes de esta citocina con respecto al grupo control ($p < 0.05$), mientras que en el primero aumentó la citocina, en el grupo Imm+Cf se detectó baja y sin embargo ambos tratamientos indujeron protección. El mecanismo responsable de esta relación se desconoce, sin embargo probablemente dependa de modificaciones en el balance Th1/Th2.

Otro cambio interesante se observó en los grupos tratados con Cf, en estos la IL-2 disminuyó más que en los ratones control, sin embargo solamente cuando el fármaco se administró de manera individual, correlacionó con la susceptibilidad más importante. Se desconoce el mecanismo responsable de este fenómeno, pero se debe considerar: **a)** que de manera basal la Cf solo potenció la producción de esta citocina ($p < 0.05$), tal como lo reportó Sewell (1987), **b)** que esta potenciación probablemente se relacionó con un incremento en la expresión de su gen, y **c)** que el parásito inhibe justamente la producción de este factor y la expresión de su receptor (Kierszenbaum F et al, 1989. Kierszenbaum F et al, 1993. Briceño J y Mosca W, 1996) y que esta supresión se lleva cabo por factores nucleares que interaccionan con la región "enhancer" del gen (Soong L y Tarleton R, 1994). De manera que la caída de IL-2 parece ser resultado de la infección "per se".

Aunque lo anterior sugiere que esta citocina es importante en el control de la parasitemia, porque su ausencia puede producir anergia (Gajewsky T et al, 1994), los resultados encontrados en el grupo Imm+ Cf no apoyaron esta posibilidad ; ¿porqué razón no se observó tal susceptibilidad aunque mostró disminución de IL-2 ?.

Una posibilidad es que la IL-4 tenga un papel más relevante de lo considerado actualmente sobre control de la infección, hay evidencias que sustentan esta posibilidad. Se ha reportado que la IL-4 activa macrófagos peritoneales murinos (MPM) "in vitro", lo que a su vez potencia la capacidad para eliminar parásitos (Wirth J et al, 1988); por otro lado se ha observado que esta citocina confiere protección contra una cepa reticulotrópica del parásito (Petray P, 1993), pero lo más interesante es que de manera natural las cepas de ratones resistentes a la infección por *T. cruzi* (C57BL/6J) producen esta interleucina, mientras que en cepas susceptibles como la C3H/HeSnJ no se encontró (Zhang L y Tarleton R, 1996). Los resultados del presente estudio refuerzan la posibilidad de un papel protector de la IL-4 ya que los grupos en los que se elevó significativamente ($p < 0.05$) (Imm e Imm+Cf) fueron los más protegidos y aunque la IL-2 disminuyó en los animales tratados con Imm+Cf no influyó sobre la protección. Sin duda la IL-4 jugó un papel importante en el control de la cepa Ninoa del parásito, sin embargo es necesario confirmarlo en las infecciones con otras cepas y de manera longitudinal. Los resultados de el grupo control mostraron una disminución de IL-2 comparable a la del grupo Imm+Cf y no produjeron IL-4, sin embargo no fueron tan susceptibles como el grupo Cf; esto sugiere que la tanto IL-2 como IL-4 en realidad se relacionan con resistencia. En este sentido hay estudios "in vitro" que muestran que sobrenadantes conteniendo IL-2 e IL-4 entre otras citocinas, son capaces de activar MPM que eliminan eficazmente los parásitos (Golden J y Tarleton R, 1991).

A la IL-10 se le ha atribuido un efecto deletéreo en el modelo Chagásico murino, se ha observado que la presencia de esta citocina se relaciona con la disminución de IFN- γ y como consecuencia se favorece el desarrollo de la infección (Barbosa de Oliveira L et al, 1996), pero al administrar anti-IL-10 se evita la disminución de la citocina tipo Th1 y se induce resistencia (Petray P, 1993. Reed S et al, 1994). En el presente estudio los grupos Imm y Cf mostraron periodos con

niveles bajos de esta citocina, sin embargo no es claro si esto pudo contribuir en el desarrollo de la infección.

La evaluación de IL-10 en ratones knock-out para esta e infectados con la cepa Y del parásito, mostraron un bajo número de parásitos en circulación y tejidos, además de altos niveles de IFN- γ y NO, sin embargo estos animales no sobrevivieron mas tiempo que los ratones silvestres (**Abrahmsohn I y Coffman R, 1996**). Lo anterior sugiere que este factor no es el único que puede influir sobre la susceptibilidad a la infección, sin embargo parece contribuir al deterioro de los animales infectados. Probablemente el efecto de la IL-10 depende del momento en que se inicia su producción, sus niveles con respecto a otras citocinas y la cronicidad con que se produce y estas variables dependen de la cepa del parásito que infecte.

Es importante analizar el balance Th1/Th2 porque es claro que durante la infección se estimularon ambos tipos de respuesta. La infección indujo un perfil mixto de citocinas que prácticamente duró toda la fase ascendente de la cinética y después de esta etapa dominó Th1. Aunque los tratamientos (con excepción de Cf) indujeron un patrón similar, la duración de la respuesta mixta pareció influir sobre la resistencia a la infección, es decir que mientras en el grupo control infectado se observó una respuesta mixta hasta la cuarta semana, los animales tratados con Imm la mantuvieron hasta el día 35 y en los ratones manejados con Imm+Cf el balance mixto se mantuvo hasta el día 35, pero nunca dominó un perfil tipo Th1. Por el contrario, el grupo Cf en ningún momento mostró un patrón definido.

Fue claro que los grupos con respuesta mixta donde además se involucraron altos niveles de IL-4 presentaron mayor protección contra la parasitemia, y que solo el grupo con una mayor duración de citocinas tipo Th2 confirió una mayor protección. En este sentido estudios "in vitro" mostraron que la capacidad los MPM eliminan eficazmente a *T. cruzi* cuando la IL-4 esta presente

en conjunto con otras citocinas como IL-2 e IL-5, pero además la capacidad antiparasitaria es potenciada cuando se agrega IFN- γ (**Golden J y Tarleton R, 1991**)

Estos resultados apoyan la posibilidad de que se requiere una respuesta mixta para proteger contra la infección por *T. cruzi* (**Zhang L y Tarleton R, 1996**). Varias investigaciones han sugerido que tanto la respuesta inmune, humoral(**Borges M et al, 1992**) como la celular(**Araujo F, 1989. Freire de Lima G et al, 1996**) son importantes en el control de la infección, pero además la combinación de ambas tiene un efecto sinérgico (**Plata F et al, 1984**). Un trabajo reciente mostró que la vacunación con antígenos específicos de *T. cruzi* pueden potenciar la resistencia contra la infección y este fenómeno es mediado por respuestas celulares y humorales (**Santori F et al, 1996**). Es importante mencionar que otras citocinas como IL-12 y GM-CSF parecen tener un efecto protector contra *T. cruzi* (**Font E y Vray B, 1995 . Font E et al, 1996. Abrahamson I y Coffman R, 1996. Hunter C et al, 1996**), sin embargo no fueron evaluadas en este trabajo por lo que es imposible saber si influyeron sobre los resultados.

Es lógico pensar que la resistencia ideal contra el parásito dependa de una respuesta inmune celular que se encargue de eliminar parásitos intracelulares y de la respuesta humoral que elimine a los parásitos en circulación; esta posibilidad es sustentada por los resultados en los ratones tratados con Cf, que aunque produjeron altos niveles de IFN- γ no controlaron la infección. La producción de esta citocina probablemente mantuvo una óptima respuesta inmune celular, mientras que la humoral pudo ser disminuida y por esta razón se observaron los altos niveles de parásitos en circulación.

Para corroborar estas suposiciones se evaluaron la respuesta celular medida como DTH y la humoral mediante la cuantificación de anticuerpos de las subclases IgG 2a (favorecida por Th1) e IgG 2b (potenciada por Th2).

Como lo representa la figura 25 una respuesta tipo Th1 potencia la DTH y la producción de anticuerpos de la subclase IgG2a, mientras que la tipo Th2 favorece la producción de otras subclases de anticuerpos incluyendo IgG2b.

La DTH se elevó la primera semana de infección con respecto a los animales normales, sin embargo ningún tratamiento la potenció durante las cuatro semanas de estudio; este efecto pudo ser consecuencia de la presencia de citocinas antagónicas como IL-10, la cual se produce durante la infección por *T. cruzi*. Por otro lado la DTH tuvo mas relación con los niveles de IL-2 que con IFN- γ , pero otras citocinas como IL-3 e IL-8 también pudieron mediar este fenómeno (Sewell W et al, 1987. Gronhoj C et al, 1995). También se debe considerar que factores como el TGF- β pudo abatir la activación de macrófagos y como consecuencia la de DTH (Silva J et al, 1991). Es imposible definir el mecanismo exacto por el que la respuesta celular fue disminuida, por lo que sería necesario medir la producción de estas citocinas y tal vez administrar anticitocinas.

La respuesta humoral que se desarrolla durante la infección por *T. cruzi*, se ha caracterizado por la activación policlonal de células formadoras de placas (PFC), en donde las de IgG2a e IgG2b se observan desde la primera semana (d'Imperio-Lima M et al, 1986), pero la producción de anticuerpos específicos de las subclases IgG2a e IgG2b se observan hasta la cuarta semana de infección con la cepa CI del parásito y después de 60 días se observó un claro predominio de IgG2a (Spinella S et al, 1992). Durante la infección con la cepa Ninoa de *T. cruzi*, esta relación se corroboró en todos los grupos (exceptuando a los tratados con Imm+Cf) y se relacionó con el momento en que dominó la respuesta tipo Th1. Por otro lado el grupo Imm+Cf produjo la IgG2b antes que en los demás grupos, pero además los niveles fueron similares a los de IgG2a; este resultado parece relacionarse con la respuesta mixta de citocinas producidas por este grupo.

La infección por *T. cruzi* de la cepa C1 retrasó la aparición de IgM, justo en el momento en que se detectaron la IgG2a e IgG2b, este resultado fue atribuido a un estado de inmunosupresión (**Spinella S et al, 1992**). Fue interesante que el retraso en la aparición de la respuesta humoral continuó con la caída de la respuesta celular, en este sentido se observó un período en el que ambas respuestas parecieron disminuir y que coincidió con el pico de la parasitemia en casi todos los grupos; sin embargo en el presente trabajo no se puede hablar de una inmunosupresión ya que en ningún momento se abatió la producción de todas las citocinas.

Aunque es poco posible, el retraso en la aparición de anticuerpos pudo ser consecuencia de un aumento gradual en la producción de estos, es decir que al inicio de la infección la cantidad de anticuerpos contra el parásito fue baja y fueron consumidos por los parásitos presentes en circulación, conforme se desarrolló la infección los niveles de anticuerpos aumentaron de modo que para la fase descendente de la parasitemia las inmunoglobulinas no fueron totalmente consumidas y por eso se detectaron elevadas. Este argumento es avalado por lo observado en el grupo Imm+Cf, el cual mostró niveles de anticuerpos desde la cuarta semana y en este momento la parasitemia fue baja.

Las evidencias anteriores sugieren una relación palpable entre el balance de citocinas y las respuestas celular y humoral.

Se ha reportado que la resistencia en el contexto de parasitemia no se relaciona con el daño en tejidos (**Younés-Chenoffi A et al, 1988**), el estudio histopatológico del músculo y el corazón en este estudio corroboró que la cepa Ninoa tiene tropismo por músculo (**Monteon V et al, 1996**), pero además mostró que los tratamientos Imm e Imm+Cf también confirieron una mayor protección para el día 60 del estudio. Sin embargo llamó la atención que los grupos control, Imm e Imm+Cf mostraron mayor daño el día 27 que en general se relacionó con uno de los momentos con mayores

niveles de parásitos y ambos disminuyeron para el día 60, por el contrario el grupo Cf mostró un incremento en el daño este mismo día; el mecanismo probablemente depende de la presencia de células TCD8+ cuya población aumenta en músculo esquelético de ratón durante la fase aguda (**Monteon V, 1993**) y que además bajo ciertas condiciones parecen ser potenciadas por altas dosis del fármaco (**Denman A y Denman J, 1992**).

Fue claro que después de 60 días de infección la protección más importante a nivel tisular, fue mediada por una respuesta mixta tipo Th1/Th2.

Es difícil entender el mecanismo de acción de la Cf, pero muy probablemente tenga relación de su actividad sobre segundos mensajeros. El Ca^{2+} es fundamental en la activación de clonas Th, se ha observado que al estimular clonas Th1 o Th2 con anti-CD3+ o Con A se detectan aumentos del Ca^{2+} del 180-500% y 0-11% respectivamente, pero en ausencia de Ca^{2+} ninguna de las clonas produce citocinas (**Gajewski T et al, 1990**). Este aumento de Ca^{2+} por otro lado parece mediar el desarrollo de apoptosis, la Cf también es capaz de inducir este fenómeno por lo que probablemente es capaz de provocar el aumento de Ca^{2+} .

Por otro lado el estímulo con toxina de cólera induce aumento de cAMP, cuando se eleva la producción de este mensajero en concentraciones de 0.1^{-3} ng/ml, se abate completamente la producción de IL-2, mientras que se necesitan concentraciones hasta de 0.1 ng/ml de esta misma toxina para reducir un 50% la producción de IL-4 (**Gajewski T et al, 1990**). Otro modelo sustenta este resultado, la administración de prostaglandina E_2 (PGE_2) induce aumento de los niveles de cAMP, lo que inhibe la producción de IFN- γ e IL-2 en clonas Th1, pero no afectan la producción de IL-4 o IL-5 de clonas Th2 (**Stam W et al, 1993**). Lo anterior sugiere que la Cf posiblemente induce aumento de Ca^{2+} lo que favorece la activación de clonas tipo Th1 y por otro lado disminuye los niveles de cAMP con lo que se evitaría apagar esta respuesta. En este contexto la administración

individual del fármaco pudo favorecer una respuesta tipo Th1 (basada en IL-2), pero al administrarse posteriormente a un estímulo antigénico, por una parte abatiría las poblaciones en proliferación, lo que resultaría en disminución de citocinas y aquellas células que sobrevivieran al tratamiento se recuperarían, sin embargo la disminución de los niveles de cAMP impediría apagar las clonas tipo Th1 por lo que se podría establecer un ambiente mixto de citocinas. La manera en que se podría evitar el aumento de cAMP probablemente depende, de la capacidad de los metabolitos del fármaco para unirse a bases nitrogenadas incluyendo la adenina (aunque no es la más común) que es componente de la molécula de cAMP y al formar el complejo "hipotético" AMP-mCf podría modificar la actividad del segundo mensajero y como resultado los niveles de cAMP activo disminuirían y serían insuficientes para desactivar la expresión de clonas Th1.

En este estudio los tratamientos indujeron cambios a nivel inmunológico que repercutieron sobre la parasitemia y sin duda destacó el efecto del tratamiento Imm+Cf. Este produjo una respuesta mixta de citocinas que confirió mayor protección en contra de la cepa Ninoa de *T. cruzi*, ya que disminuyó significativamente el grado de parasitemia, retrasó el día pico y en el día 60 este grupo mostró el menor daño a nivel tisular.

225715

X)Conclusiones

- El tratamiento con Cf favoreció la parasitemia y el daño tisular después de 60 días.
- El balance de citocinas en los animales tratados con el fármaco mostró un incremento en la producción de IFN- γ , pero no una potenciación general de una respuesta tipo Th1.
- El tratamiento con Imm después de 60 días solamente protegió a nivel tisular y aumentó ligeramente la producción de IL-4.
- El grupo Imm+Cf confirió la protección más clara contra la parasitemia y el daño tisular después de 60 días e indujo una producción mixta de citocinas.
- Los resultados anteriores sugieren que la protección contra la infección con *T. cruzi* de la cepa Ninoa parece depender de un balance mixto de citocinas.

X) Bibliografía

Abrahamsohn I y Coffman R. (1996). IL-10, TNF, IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **91** (suppl) : 35.

Arala-Chaves M. (1992). Is prophylactic immunostimulator of the host against pathogenic microbial antigens an adequate strategy of immunoprotection?. Scand. J. Immunol. **35**:495-500.

Araujo F. (1989). Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. Infect. Immun. **57** : 2246-2248.

Arndt C et al. (1988). Cerebrospinal fluid penetration of active metabolites of cyclophosphamide and ifosfamide in rhesus monkeys. Cancer Res. **48** :2113-2115.

Barbosa de Oliveira L et al. (1996). Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase "in vivo" susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. Cell. Immunol. **170** :41-53.

Bojalil R et al. (1993). Thymus -related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis in *Taenia crassiceps*. J. Parasitol. **79**:384-9.

Borges M et al. (1992). Modulation of parasitemia and antibody response to *Trypanosoma cruzi* by Cyclophosphamide in *Calomys callasus* (Rodentia, cricetidae). Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **34** :1-8.

Briceño J y Mosca W. (1996). Defective production of interleukin 2 in patients with Chagas' disease. Purified IL-2 augments in vitro response in patients with chagasic cardiomyopathy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **91** : 691-607.

Burleigh B y Andrews N. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. Annu. Rev. Microbiol. **49** : 175-200.

Calabrese K et al. (1996). Comparation of cyclophosphamide and cyclosporine A action in experimental Chagas' Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **91** (suppl) : 319.

Calabresi P y Parks R. (1980). Antiproliferative agents and drugs used for immunosuppression, in : The pharmacological basis of therapeutics. ed. Macmillan, New York, p.1250.

Camargo I et al. (1991). *Trypanosoma cruzi*: Early Resistance Induced by Culture Derived Trypomastigotes. Exp. Parasitol. **73** :260-268.

Cardillo F et al. (1996). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by Gamma Interferon and Interleukin 10 : Role of NK cells. Infect. and Immun. **64** : 128-134.

Cruz D. (1994). Caracterización de una cepa Mexicana de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de licenciatura. UNAM, México.

Cuneo C y Molina de Raspi E. (1989). Prevention of electrocardiographic and histopatologic alteration in the murine model of Chagas disease by preinoculation of an attenuated *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **31**:248-55.

Denman A y Denman D. Alkiling Agents. En: Rugstad HE. y Endersen L. Immunopharmacology in Autoimmune Disease and Transplantation. Plenum Press. New York. USA. 1992, pp 139-58.

d'Imperio Lima M et al. (1986). Persistence of Polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' Disease. J. Immunol. **137** : 353-356.

Eise K et al. (1994). Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. J. Exp. Med. **179** :347-351.

Faust E et al. Parasitología Clínica. Salvat. Barcelona. España 1979. p- 883.

Font E y Vray B. (1995). Relationship between Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, Tumor Necrosis Factor- α and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. Parasit. Immunol. **171** : 135-141.

Font E et al. (1996). Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor : Involvement in control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Infect. Immun. **64** : 3429-3434.

Freire de Lima G et al. (1996). Chronic experimental Chagas' disease : Functional Syngenic T-B-cell cooperation In vitro in the absence of an Exogenous Stimulus. *Infect. Immun.* **64** : 2861-2866.

Gajewski T et al. (1990). Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathways by Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.* **144** : 4110-4120.

Golden J y Tarleton R. (1991). *Trypanosoma cruzi* : Cytokine effects on Macrophage trypanosidal activity. *Exp. Parasitol.* **72** :391-402.

Greenberger M et al. (1995). Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Immunol.* **155** :722-729.

Gronhøj C et al. (1995). The Delayed- Type Hypersensitivity Reaction Is Dependent on IL-8. Inhibition of a Tuberculin Skin Reaction by an Anti-IL-8 Monoclonal Antibody. *J. Immunol.* **155** :2151-2157.

Hunter C et al. (1996). Interleukin-12 mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent of Tumor Necrosis Factor alpha and Gamma Interferon. *Infect. Immun.* **64** : 2381-2386.

Kemp M et al. (1993). Interferon gamma and Interleukin-4 in Human *Leshmania donovani* infections. *Immunol. Cell. Biol.* **71**: 583-7.

Kierszenbaum F et al. (1989). *Trypanosoma cruzi* reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by supressing the expression of the p55 and p70 receptor components. *J. Immunol.* **143** :275-279.

Kierszenbaum F et al. (1993). Does interleukin 2 restore lymphocyte responses supressed by *Trypanosoma cruzi* ?. *Immunol.* **80** : 454-450.

King Ch et al. (1995). IL-12 regulation of parasite antigen-drive IgE production in human helminth infections. *J. Immunol.* **155** : 454-461.

Lowry O et al. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **14** : 425-449.

Maggi E et al. (1994). Ability of HIV to promote a Th1 to Th2 shift and to replicate pferentially in Th2 and Th0 cells. *Science.* **265** :244-248.

Mazzotti L. (1940). Dos casos de Enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. Gac. Med. (Mex). **70**: 417-420.

McHugh S et al. (1995). The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen and antigen stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. Clin. Exp. Immunol. **99**:160-7.

Moglorini P et al. (1991). Macrophage NO₂ production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN-g. J. Immunol. Methods. **139** : 107-114.

Monteon V. (1993). Cinética de la inflamación y la parasitosis causada por una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. Tesis doctoral. IPN. México.

Monteon V et al. (1996). American Trypanosomiasis : In Situ and Generalized Features of Parasitism and Inflammation Kinetics in a Murine Model. Exp. Parasitol. **83** : 267-274.

Mosmann T y Coffman R. (1989). TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. Ann. Rev. Immunol. **7**: 145-73.

Nickerson P et al. (1989). Trasfusion associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. Ann. Int. Med. **111**: 851-853.

Parish N et al. (1995). Tolerance induction as a therapeutic strategy for control of autoimmune endocrine disease in mouse models. Immunol. Rev. **144** :269-300.

Paul W. Fundamental Immunology. 3a. Raven Press New York. New York, USA. 1993. p-1490.

Pereira M et al. (1996). Recrudescence induced by cyclophosphamide of Chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice is influenced by parasite strain. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. **91** : 71-74.

Perlmann H et al. (1994). IgE elevation and IgE antimalaria antibodies in *Plasmodium falsiparum* malaria : association of high IgE levels with cerebral malaria. Clin. Exp. Immunol. **97** : 284-292.

Petray P. (1994). Effect of anti-IFN- γ and anti-IL-4 administration on the resistance of mice against infection with reiculotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. Immunol. Lett. **35** : 77.

Plata F et al. (1984). Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *T. cruzi* in vitro. Eur. J. Immunol. **14** : 930-935.

Reed S et al. (1994). IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma Cruzi* infection. J. Immunol. **153**: 3135-40.

Romagnani S. (1994). Lymphokine production by human T cell in disease states. Ann. Rev. Immunol. **12**:227-57.

Romani L et al. (1994). Neutralization of IL-10 up-regulate nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. J. Immunol. **152** :3514-3521.

Romani L y Howard D. (1995). Mechanisms of resistance to fungal infections. Current Opinion in immunology. **7** : 517-523.

Rottenberg M et al. (1995). Cytokine gen expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. Scand. J. Immunol. **41**: 164-70.

Rugstad H et al. Immunopharmacology in Autoimmune Disease and Transplantation. Plenum Press. New York. USA. 1992. pp 273-290.

Santori F et al. (1996). A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82 kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. Infect. Immunity. **64** : 1093-1099.

Sciutto E. Aportaciones de cisticercosis murina experimental por *Taenia crassiceps* al conocimiento de los factores biológicos que participan en la suceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *Taenia solium*. Tesis doctoral 1990. UNAM, México.

Sewell W et al. (1987). Potentiation of delayed-type hypersensitivity by pertussigen or cyclophosphamide with release of different lymphokines. Immunol. **61** : 483-488.

Silva J y Rossi M. (1990). Intensification of acute *Trypanosoma cruzi* myocarditis in Balb/c mice pretreated with low doses of ciclophosphamide or gamma irradiation. J. Exp. Parasitol. **71** : 33-39.

Silva J et al. (1991). Regulation of *Trypanosoma cruzi* Infections In vitro and In vivo by Transforming Growth Factor β (TGF- β). J. Exp. Med. **174** : 539-545.

Silva J et al. (1992). Interleukin-10 and Interferon- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J. Exp. Med. **175** : 169-174.

Soares R et al. (1994). Vaccination of the *Leishmania major* susceptible Balb/c mouse. Y. The precise selection of peptide determinant influence CD4+ T cell subset expression. Int. Immunol. **6**:785-94.

Soong L y Tarleton R. (1994). *Trypanosoma cruzi* infection supresses nuclear factors that bind to specific sites on the interleukin-2 enhancer. Eur. J. Immunol. **24**: 16-23.

Spinella S et al. (1992). *Trypanosoma cruzi* : Predominance of IgG2a in Nonspecific Humoral Response during Experimental Chagas' Disease. Exp. Parasitol. **74** : 46-56.

Stam W et al. (1993). Pharmacology Modulation of Th1- and Th2- Associated Lymphokine Production. Life Science. **53** : 1921-1934.

Stevenson M y Tam M. (1993). Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage Plasmodium chabaundi AS infection in resistant and susceptible mice. Clin. Exp. Med. **92** : 77-83.

Svetic' A et al. (1993). A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. J. Immunol. **150** : 3434-3441.

Tabi Z et al. (1988). Lethal vaccinia infection in cyclophosphamide-suppressed mice is associated with decreased expression of Thy-1, Lyt-2 and L3T4 and diminished IL-2 production in surviving T cells. Immunology. **63** : 423-429.

Tarazona R et al. (1995). Chlorpromazine amplifies macrophage dependent IL-10 production "in vivo". J. Immunol. **154**: 861-70.

Tarleton R. (1991). Regulation of Immunity in *Trypanosoma cruzi* Infection. Exp. Parasitol. **73** : 106-109.

Taylor-Robinson A et al. (1993). The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. Science. **260** :1931-1933.

Thomson A et al. (1987). Cyclophosphamide-induced eosinophilia in the rat: concomitant changes in Tcell subsets, B cells and large granular lymphocytes within lymphoid tissues. Immunol. **60** : 383-388.

Torrinco F et al. (1991). Endogenous IFN- γ is rrequired for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J. Immunol. **146** : 3626-3632.

Vandekerchove F et al. (1994). Modulation of T cell responsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection, analysis in different lymphoid compartments. **16**: 77-85.

Velasco O et al. (1992). Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Salud Pública (México). **34**: 186-195.

Virchhoff L. (1993). American Trypanosomiasis (Chagas' Disease)- A tropical disease now in the United States. N. Eng. J. Med. **329** :639-644.

WHO. (1991). Control of Chagas Disease. Technical reports series 811.

Wirth J et al. (1985). Enhancing Effects of Gamma Interferon on Phagocytic Cell Association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. **49** :61-66.

Wirth J et al. (1988). Effect of interleukin 4 on macrophage interactions with *Trypanosoma cruzi* : Comparasion with interferon- γ . FASEB Journal. **2** :p-a 453.

Younès-Chennoufi A et al. (1988). Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4+). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **82** : 84-89.

Zhang L y Tarleton R. (1996). Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection in situ immunocytochemistry : lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. Eur. J. Immunol. **26** : 102-109.

XI) Apéndice

Solución Buffer de Fosfatos (PBS 10X)

NaCl 80 g.

KCl 2 g.

Na₂HPO₄ 11.6 g.

KH₂PO₄ 2 g.

Diluido en un litro de H₂Odd y ajustado a pH =7.0-7.2

PBS/Tween

Adicionar 0.5 ml de Tween 20 a 1 litro de PBS 1X

Buffer de Carbonatos 0.1 M

NaHCO₃ 0.84 g en 100 ml de H₂Odd y ajustar a un pH=8.2

Solución hemolizante

Solución A :

NH₄Cl 0.16M 0.86 g diluido en 100 ml de H₂Odd

Solución B :

Tris base 0.17M 2.05 g diluidos en 100 ml de H₂Odd

Mezclar 8 partes de solución A con 2 partes de solución B y ajustar a pH=7.2

Medio LIT

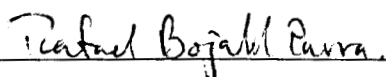
NaCl	4.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	8.0 g
Dextrosa	2.0 g
Triptosa	5.0 g
Infusión de Hígado	5.0 g

Agregar 900 ml de H₂O, ajustar a pH=7.4, esterilizar en autoclave a 15 lbs. de presión durante 20 min. y agregar 100 ml de suero fetal bovino inactivado. Por último adicionar 25 mg de hemina/litro de medio.

Nota : La hemina se disuelve previamente en trietanolamina y se prepara un stock de 50 mg/ml de manera que 500 ml del stock contienen 25 mg de hemina.

225715

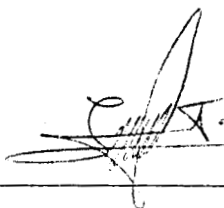
Los integrantes del comité tutorial designado por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa aprobó la presente tesis el mes de Septiembre de 1997.



Dr. Rafael Bojalil Parra
Director de tesis



Dr. Ruben Dario Martinez
Asesor Interno



M. en C. Ignacio Terrazas Valdés
Asesor Externo

Se realizó el examen de grado el
día 10 de octubre de 1997

