

INMUNOSUPRESION PRODUCIDA POR *T. CRUZI* SOBRE LA RESPUESTA PRIMARIA: CELULAS INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA INMUNE (II Parte)

Trabajo realizado por el Profesor Asistente Miguel Feoli Bonilla, en el Laboratorio de Inmunología de la Universidad Nacional Autónoma de México para optar el Grado de Magister en Ciencias Biomédicas, Especialidad Microbiología.

INTRODUCCION

*Este trabajo tiene por objeto continuar el estudio tendiente a averiguar el nivel al cual se lleva a cabo la inmunosupresión producida por el parásito *T. cruzi*.*

Por trabajos realizados anteriormente se ha demostrado que los macrófagos (1) y los linfocitos T (2) no están afectados como consecuencia de la infección de este parásito.

La cooperación entre linfocitos T y B en la respuesta humoral fue inicialmente sugerida en 1966 por los experimentos de Claman y col. (3), 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. (4), usando ratones timentomizados 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 (5) encontraron que ratones timentomizados 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 fue confirmado en ratones irradiados que recibieron células de timo de CBA, células de médula CBA/T₆T₆ y eritrocitos de carnero, y en donde todas las células formadoras de anticuerpo obtenidas tenían el cromosoma T₆ y por tanto derivaban de la médula ósea (6).

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 por 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 (7), a lipopolisacárido de Escherichia coli, a polivinilpirrolidona (8) y a flagelina polimerizada (9), 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 (10).

Generalmente, se considera una respuesta T-independiente cuando la respuesta de animales neonatalmente timectomizados, irradiados letalmente y reconstituídos 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 θ y complemento.

Sabido de que la vía aferente (1, 2) de la respuesta inmune no manifiesta daño producido por T. cruzi, quedaba aún por averiguar que sucedía a nivel de linfocitos B.

Brevemente, podemos discutir el efecto del hapteno en la respuesta de anticuerpos. Se define a los haptenos como pequeñas sustancias químicamente definidas, tales como el trinitrofenol (TNP), la cual puede combinarse específicamente con anticuerpos pero comúnmente por sí mismas no inducen una respuesta inmune, esto es, son antigénicos pero no inmunogénicos. Para inducir una respuesta de anticuerpos los haptenos pueden acoplarse a acarreadores macromoleculares, tal como albúmina de suero bovino (BSA), para formar un complejo inmunogénico.

Estudios sobre respuesta acarreador-hapteno en huéspedes receptivos manifiestan una clara evidencia que la memoria inmunológica para la fracción hapténica reside en clones celulares de linfocitos B (11). En virtud de lo anterior diseñamos experimentos en los cuales los ratones infectados y normales recibieron un complejo acarreador-hapteno (BSA-TNP).

MATERIAL Y METODOS

Animales. En los experimentos se utilizaron ratones de la cepa Carworth Farm (CF 1) de 18 a 20 g. de peso. Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico con rejilla metálica a una temperatura entre 16 y 20° C. y se alimentaron con purina para ratones y agua *ad libitum*.

Trypanosoma cruzi. Se usó una cepa mio y reticulotrópica de *T. cruzi* proporcionada por el doctor F. Navarrete del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Guadalajara, Jal. y conservada por dos años con virulencia estabilizada. El desarrollo de la infección por *T. cruzi* fue observada rutinariamente a lo largo del experimento determinando el número de parásitos en sangre periódicamente después de la infección y se hicieron estudios histopatológicos del corazón a la muerte del animal.

Determinación de la LD₅₀ de la cepa de tripomastigotes de T. cruzi. Para determinar la dosis letal de tripomastigotes necesaria para matar el 50% de los ratones en un período de 30 días (LD₅₀/30 días), se usó el método de Reed and Muench (12). La dosis LD₅₀ resultó ser de 387 tripomastigotes/animal.

Nosotros usamos un inóculo que contenía 2×10^4 tripomastigotes por animal que corresponde a una dosis letal del 100%, o 51.6 veces la LD₅₀.

Antígenos. i) Se emplearon eritrocitos de burro (EB) lavados por 3 veces en solución salina isotónica y se ajustaron a una concentración de 1×10^9 células/ml. En todos los casos, los ratones se inocularon por vía intraperitoneal (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. (13). 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 antieritrocito de burro según el método de Campbell (14). Animales con títulos de anticuerpos 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. (15).

ii) *Obtención del fragmento Fab'.* El fragmento Fab' se obtuvo de acuerdo al método descrito por Porter (16). 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 8.0, que contenían 0.01 M de cisteína y 0.002 M de etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA). Después de la incubación la solución fue 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 fue pasado por una columna de carboximetilcelulosa (CMC) y dializado contra solución salina. La columna de fraccionamiento empleada fue de 20 × 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. (15).

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

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 volumen 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 láminas portaobjetos de acuerdo con el método descrito por Golub, y col. (17). 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 1:1 en SSB forman placas de lisis. El número de CFA se calculó por el método de Golub y col. (17).

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 (17).

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 cloruro 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 (17).

Sensibilización de eritrocitos de burro con Fab'-TNP. Los glóbulos rojos de burro se recubrieron con el Fab'-TNP por el método descrito por Stransbauch y col. (18), por incubación del conjugado Fab'-TNP con eritrocitos de burro al 8% en SSB por 60 minutos a 37° C. seguido de 3 lavados con SSB. La suspensión de eritroci-

tos sensibilizados fue resuspendida en SSB a una concentración del 10%. Los eritrocitos sensibilizados fueron probados por hemaglutinación contra un antisuero anti-TNP. Obtenidos de ratones inmunizados con BSA-TNP.

Determinación dosis-respuesta al antígeno BSA-TNP. Se inocularon 3 diferentes dosis del complejo BSA-TNP a 3 grupos de 5 ratones cada uno. Las dosis estudiadas fueron 200, 400 y 800 ug. También se probó la acción de 300 ug del conjugado inculado con adyuvante completo de Freund. Las células formadoras de anticuerpo se determinaron 7 días después por el método de Jerne y Nordin (19) modificado por Golup y col. (17).

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 (20) se aplicó para estimar el significado de las diferencias principales. Cuando las varianzas fueron heterogéneas, la prueba U de Mann-Whitney (21) fue usada para determinar el significado de estas diferencias.

RESULTADOS

Determinación del número de parásitos en ratones infectados con T. cruzi. i) *Cuenta de parásitos en sangre.* La cuenta de parásitos en la sangre de ratones infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* se muestra en la Tabla número I. Los tripomastigotes se observaron en todos los ratones 24 horas después de la infección. El número de parásitos aumentó en el curso del experimento llegando a ser máximo el día 23.

ii) *Cuenta de parásitos en músculo cardíaco.* En el corazón de los animales infectados se observaron inicialmente nidos con formas de amastigotes, el día 9 después de la infección. El número de nidos observados después de examinar 1200 campos microscópicos aumentó después de 9 días. Este aumento se manifestó claramente 18 días después de la infección (Tabla número I). Posteriormente el número de nidos en el tejido del miocardio disminuyó. Por otro lado, el peso del corazón de los animales infectados presentó un incremento gradual durante todo el experimento. La diferencia en el peso de los corazones entre el grupo control y el

infectado observada después de 18 días de infección, fue significativa (Tabla número I).

TABLA NUMERO I

Determinación de niveles de parásitos en ratones infectados con *T. cruzi*.

Días después de la infección a)	Ratones por grupo	Parásitos en sangre $\times 10^6$ ml. promedio	% nidos de amastigotes en el corazón (Promed.) b)	Peso del corazón	
				\pm E. E. mg.	P. c)
1	6	0.001	0	117.7 \pm 5.04	> 0.6
4	5	0.05	0	115.4 \pm 6.09	> 0.8
7	6	0.13	0	118.2 \pm 4.15	> 0.5
9	6	1.26	4.25	123.2 \pm 3.15	> 0.1
11	5	4.62	5.0	131.8 \pm 6.52	> 0.05
14	6	10.31	17.2	122.2 \pm 4.87	> 0.2
16	6	11.98	37.1	134.4 \pm 7.57	> 0.05
18	4	10.85	93.1	152.1 \pm 6.79	< 0.01
23	4	26.71	24.0	147.3 \pm 11.78	< 0.05
25	4	14.23	9.3	152.5 \pm 12.4	< 0.05
Grupo control no infectado	6	0	0	113.3 \pm 6.2	

- a) Ratones CFL inoculados i. p. con 2×10^4 tripomastigotes de *T. cruzi*.
- b) Secciones de corazón de ratones infectados fueron examinados para investigar nidos de amastigotes de *T. cruzi*. El porcentaje de nidos de amastigotes fue calculado de los datos obtenidos después de contar 1200 campos microscópicos.
- c) El valor de *P* fue calculado por comparación de los grupos de ratones infectados y controles para la prueba *t* de Student.

Efecto de dosis-respuesta a TNP en ratones normales. Se ha observado que animales infectados con *T. cruzi* muestran una respuesta inmune disminuida a antígenos particulados como eritrocitos de burro. Esta vez, estudiamos la respuesta de animales infectados a un antígeno soluble no relacionado, como fue 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 II 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 del antígeno soluble BSA-TNP. Los resultados que describe la Tabla III 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 ($P < 0.01$).

TABLA II

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

a) Días después de la inmunización con BSA-TNP.

TABLA III

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 a)	CFA/10 ⁷ células ± error estándar b)		
	Control	Infectados	P c)
—4	27.3 ± 7.6	36.4 ± 6.9	> 0.05
2	53.8 ± 7.7	48.2 ± 15.2	> 0.7
8	53.8 ± 7.6	12.0 ± 3.7	< 0.01
12	52.4 ± 4.0	19.4 ± 7.3	< 0.01

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

b) La determinación de CFA fue hecha 7 días después de la inmunización con BSA-TNP.

c) El valor de P fue calculado de acuerdo al método de *t* de Student-Fisher.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en estos estudios sobre el efecto que tiene la infección experimental con *T. cruzi* en la respuesta inmune primaria a un antígeno heterólogo indica la existencia de un estado de inmunosupresión. La supresión se observó entre el 5º y 7º día después de la infección. En esos días el número de parásitos en sangre era aproximadamente de 1×10^5 tripomastigotes/ml.

La necesidad de usar eritrocitos de burro fue debida a que ha sido demostrado que el suero de conejos infectados con *T. brucei* contiene aglutininas heterófilas (22) para los eritrocitos de borrego, aunque ratones similarmente infectados no las contienen (23). Por lo tanto, el uso de eritrocitos de burro elimina la posibilidad de antígenos de reacción cruzada en los ensayos de células formadoras de anticuerpos (CFA).

El análisis de CFA llevado a cabo en ratones infectados con *T. cruzi* pero no inmunizados con eritrocitos de burro, revela solamente 6×10^6 CFA. Este número de células formadoras de anticuerpos fue similar en los ratones poco parasitados y en los altamente parasitados que no habían sido inmunizados con EB.

El efecto inmunosupresor en la respuesta primaria llega a ser más evidente cuando el número de parásitos aumenta tanto en la sangre periférica como en el tejido del músculo cardíaco. En cambio, no hubo respuesta disminuida de CFA en los estados iniciales de la infección, cuando el número de parásitos en sangre estaba por abajo de 1×10^6 tripomastigotes/ml y aún no se observan nidos de amastigotes en músculo cardíaco.

Es interesante observar que en los ratones infectados con *T. cruzi* la actividad fagocítica fue mayor que la observada en los ratones no infectados (1). Se sabe que los macrófagos juegan un papel importante en la respuesta inmune (24, 25), era por tanto lógico esperar que la respuesta inmune a antígenos particulados como el usado en este trabajo (EB), fuera normal. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los animales infectados presentan un número significativamente disminuido de células formadoras de anticuerpos (1).

El efecto inmunosupresor ejercido por varios agentes infectantes sobre la respuesta inmune es bien conocido (23, 26, 27, 28). Se han postulado varias hipótesis para explicar la inmunosupresión observada durante infecciones por protozoarios, pero hasta ahora han sido inadecuadas ya que los eventos que siguen a la administración del antígeno son extremadamente complejos (23, 26, 29). Los protozoarios pueden inducir inmunosupresión a diferentes niveles. Por ejemplo, Strikland y col. (29), han reportado en ratones infectados con *Toxoplasma gondii* una depresión de la respuesta de IgM a eritrocitos de borrego. Por otro lado, infecciones por *Plasmodium berghei* en ratones, produce una marcada reducción de la respuesta inmune primaria y secundaria a eritrocitos de borrego, la cual coincide con el aumento de la parasitemia (27, 30, 31). Infecciones debidas a otras especies de tripanosoma y sus efectos sobre la respuesta inmune, han demostrado un comportamiento variable. Por ejemplo, la infección por *T. gambiense* daña no solamente la respuesta inmune humoral sino también la respuesta inmune mediada por células (32). En este tipo de tripanosomiasis la parasitemia observada es baja. La infección por *T. brucei* en ratones produce ambas, una alta parasitemia y una severa alteración de la función del sistema reticulo-endotelial que se traduce en una falla de la respuesta humoral y una ligera reducción en la inmunidad mediada por células (33). Además, *T. rhodesiense* (Nyoriana), casi en las mismas condiciones experimentales

de nuestros estudios, induce muy elevados niveles de parasitemia (tan altos como 4×10^8 parásitos por ml.) y no tienen ningún efecto o muy poco, sobre la respuesta de anticuerpos (34). Como podemos ver, las infecciones producidas por diferentes especies de tripanosoma inducen diferentes efectos sobre la respuesta inmune.

La literatura no da explicación del mecanismo de inmunosupresión a eritrocitos de burro en ratones infectados con *T. cruzi*. Sin embargo, nuestros resultados no indican que el bloqueo del sistema retículo-endotelial sea el responsable de la respuesta disminuida como fue sugerido previamente (23, 26, 35) ya que la actividad fagocítica del sistema retículo-endotelial está aumentada en los animales infectados (1). Se ha sugerido que la competencia antigénica (fenómeno que produce respuesta humoral disminuida) juegue un papel de esta inmunodepresión, aunque no siempre se ha observado inmunosupresión en condiciones similares en infecciones por otros protozoarios (30), pero en nuestro reporte anterior quedó bien demostrado que la inmunodepresión producida por *T. cruzi* no es debida a un efecto competitivo del antígeno (1).

El hecho de que la inmunosupresión ocurra en enfermedades producidas por diferentes microorganismos (27), indica que debe existir un común denominador en su efecto sobre la respuesta inmune. Por ejemplo, se ha discutido que los organismos en proliferación pueden liberar sustancias metabólicas que pueden de alguna manera ser deletéreas para los linfocitos inmunocompetentes (26). En el caso de la infección por leishmania se ha demostrado un aumento significativo en la globulina gamma del suero (26), lo que podría implicar la formación de complejos antígeno-anticuerpo los cuales podrían ser responsables de la supresión (36). El requerimiento de que la globulina debe ser específica para el correspondiente antígeno no ha sido establecido plenamente (37). Sin embargo, se ha demostrado que la gran concentración de globulina gamma que se produce durante una infección por leishmania no es específica para antígenos homólogos, aunque los anticuerpos a tejidos autólogos pueden existir y se han encontrado depósitos amiloides en el riñón (38).

Otro mecanismo potencial que puede tomarse en cuenta en la inmunosupresión es el papel del interferón, ya que estas infecciones por protozoarios presentan una fase intracelular obligada. La estimulación de producción de interferón por estos parásitos en la misma forma que los virus, es una posibilidad que no puede ser

eliminada. Por ejemplo, en un reporte reciente Chester, Paucker y Merigan (39) han demostrado *in vivo*, la influencia inmunosupresora del interferón exógeno de ratón para las células productoras de anticuerpos en ratones inmunizados con eritrocitos. Además se ha demostrado que el interferón inhibe la síntesis de DNA inducida por fitohemaglutinina o por células alogénicas (40). En estas condiciones el interferón puede, de alguna manera, modificar la función de los linfocitos, tanto los derivados del timo como los derivados de la médula ósea. Por lo que respecta a una posible alteración de la función de linfocitos "T" y "B" por el interferón, se ha reportado que la incidencia de enfermedades autoinmunes es extraordinariamente baja en aquellos países en los cuales se observan problemas de parasitismo múltiple e intenso (41).

La supresión en la respuesta inmune fue 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 de T en animales infectados con *T. cruzi*; los experimentos de limpieza de carbón como índice de actividad fagocítica retículo-endotelial (2) y los estudios de transferencia de macrófagos (1), 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 ésta suposición.

RESUMEN

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

Quedaba aún por averiguar, que sucedía a nivel de la vía eferente, es decir, a nivel de los linfocitos B. Diseñamos experimentos en los cuales los ratones infectados y los normales recibieron un complejo acarreador-hapteno (BSA-TNP). Siete días después de la administración del antígeno se determinaron células formadoras de anticuerpos contra TNP encontrándose a partir del día

8º, después de la infección, un abatimiento significativo en el número de estas células. Estos resultados nos indican que probablemente la inmunosupresión observada es consecuencia de un daño a nivel del linfocito B.

SUMMARY

This work was aimed to study the mechanism responsible for the decrease of the capacity, to form antibodies, of the infected animals with *T. cruzi*.

In the preceding work (Rev. Col. Cien. Farm. 3, Nº 1. 1976) we still had to see what happened at the B lymphocyte level. Therefore, we designed some experiments in which infected mice and normal mice received a carrier-hapteno complex (BSA-TNP). After seven days of the application of the antigen, the antibodies forming cells against TNP were examined.

A decrease in the number of these cells, after 8 days of the application, was found. This probably means that the observed immunosuppression is due to a damage at the B lymphocyte level.

REFERENCIAS

1. FEOLI, M. A. Inmunosupresión en la infección experimental con *T. cruzi* sobre la respuesta inmune primaria: Efecto sobre las células involucradas en la formación de anticuerpos (I parte). Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 3: 1976.
2. 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.
3. CLAMAN, H. N.; CHAPERON, E. A. Y TRIPLETT, R. F. Thimus marrow cell combinations synergism in antibody production. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.), 122: 1167, 1966.
4. DAVIES, A. J. S.; LEUCHARS, E.; WALLIS, V.; MARCHANT, R. Y ELLIOT, E. V. The failure of thymus derived cells to make antibody. Transplantation, 5: 22, 1967.
5. 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.

6. 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.
7. WOWARD, 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. KRETH, H. W. and WILLIAMSON A. R. A cell surveillance model for lymphocyte cooperation: the role of allogeneic lymphocytes in stimulating a single antibody-forming clone. *Nature (Lond.)*, 234: 454, 1971.
12. REED, L. R. Y MUENCH, H. A simple method of estimation of 50% en point. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493, 1938.
13. 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.
14. CAMPBELL, D. H.; GARVERY, J. S.; GREMMER, N. E. Y SUSSDORF, D. H. *Methods in Immunology*. Benjamin W. A., Inc., New York, 1963.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. STRANSBAUCH, P.; SULICA, A. Y GIVOL D. General method for detection of cells producing antibodies against haptens and proteins. *Nature*, 227: 68, 1970.
19. JERNE, N. K. Y NORDIN, A. A. Plaque formation in agar by single cell antibody-producing cells. *Science*, 140: 405, 1963.

20. FISHER, R. A. *Statistical methods for research workers* (5 ed.) Edinburg: Oliver y Boyd, 1934.
21. 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.
22. GOBLE, F. C. *En Immunity to Parasitic Animals*. G. J. Jackson, R. Herman e I. Singer (eds.), p. 655, Appleton-Century Crofts, New York, 1970.
23. GOODWIN, L. G.; GREEN, D. G.; GUY, M. W. y VOLLER, A. Immunosuppression during trypanosomiasis. *Br. J. Exp. Pathol.*, 53: 40, 1972.
24. FELDMAN, M.; UNANUE, E. R. *En Progress in Immunology*. B. Amos (Ed.), n. 1379, Academic Press, New York, 1971.
25. MOSIER, D. E. A requirement for two cell types for antibody formation *in vitro*. *Science*, 158: 1573, 1967.
26. CLINTON, B. A.; STAUBER, L. A. y PALCZUK, N. C. *Leishmania donovani*: Antibody response to chicken ovalbumin by infected golden hamsters. *Exp. Parasitol.*, 25: 171, 1969.
27. SALAMAN, M. H. Immunosuppressive effects in infection. Immunodepression by mammalian viruses and plasmodia. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 63: 11, 1970.
28. TURK, J. L. Immunological aspects of clinical leprosy. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 63: 1053, 1970.
29. STRICKLAND, G. T.; PETTITT, L. E. and VOLLER, A. Immunodepression in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 22: 452, 1973.
30. GREENWOOD, B. M.; PLAYFAIR, J. H. L. y TORRIGIANI, G. Immunosuppression in murine malaria. *Clin. Exp. Immunol.*, 8: 467, 1971.
31. LOOSE, L. D.; COOK, J. A. y DI LUZIO, N. R. Malarial Immunosuppression. A macrophage mediated defect. *Proc. Helminthol. Soc. (Wash.)*, 39: 484, 1972.
32. GREENWOOD, B. M.; WHITTLE, H. C. y MOLINEUX, D. H. Immunosuppression in Gambian trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67: 846, 1973.
33. URQUHART, G. M.; MURRAY, M.; MURRAY, P. K.; JENNINGS, F. W.; BATE, E. Immunosuppression in *Trypanosoma brucei* infections in rats and mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67: 528, 1973.
34. GARCÍA, W. Z. *Tropenmed. Parasit.*, en prensa.
35. DÍAS, E. Le *Trypanosoma cruzi* et ses rapports avec le système réticulo-endothélial, *C. R. Soc. Biol., Paris*, 110: 206, 1932.

36. UHR, J. W. y MÖLLER, G. Regulatory effects of antibody on the immune response. *Adv. Immunol.*, 8: 81, 1968.
37. GREENBURY, C. L. y MOORE, D. H. Non-specific antibody-induced suppression of the immune response. *Nature (Lond.)*, 219: 526, 1968.
38. GELLHORN, A.; VAN DYKE, H. B.; PYLES, W. J. y TUPIKOVA, N. A. Amyloidosis in hamsters with leishmaniasis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 61: 25, 1946.
39. CHESTER, T. J.; PAUCKER, K. y MERIGAN, T. C. Suppression of mouse antibody producing spleen cells by various interferon preparations. *Nature (Lond.)*, 246: 92, 1973.
40. LINDALL-MAGNUSSON, P.; LEARY, P. y GRESSER, I. Interferon inhibits DNA synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohaemagglutinin or by allogeneic cells. *Nature (New Biology)*, 237: 120, 1972.
41. GREENWOOD, B. M. Autoimmune disease and parasitic infections in nigerians. *Lancet*, ii, 380, 1968.