

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por el Profesor Asistente MIGUEL FEOLI BONILLA, para optar al grado de Maestro en Ciencias Biomédicas, especialidad Microbiología.

INTRODUCCION

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

Asimismo, el daño causado por T. cruzi en la enfermedad aguda, resulta, en parte, de la destrucción de tejidos asociados con las fases intracelulares del parásito. Las cepas de T. cruzi tienen, en su fase de tripomastigotes, diferente habilidad para invadir tejidos específicos. Cepas retículo y miotrópicas representan extremos en este espectro; manifestando la primera generalmente mayor virulencia (2). Sin embargo, el sistema retículoendotelial juega un papel muy importante en la resistencia contra la infección (3). Además de los antecedentes mencionados, en nuestro laboratorio se han hecho experimentos para estudiar el efecto de la infección

por T. cruzi, sobre la habilidad para formar anticuerpos contra antígenos no relacionados (eritrocitos de burro), encontrándose una inmunosupresión importante, tanto en respuesta primaria como en respuesta secundaria (4).

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

Es de sobra conocido que en la respuesta inmune humoral intervienen tres tipos de células: macrófagos, linfocitos derivados del timo, llamados T, y linfocitos dependientes de la médula ósea, o B.

Hay consideraciones directas e indirectas para establecer la importancia de las interacciones macrófago-linfocito en la inducción de la respuesta inmune (5, 6, 7, 8). Las interacciones entre linfocitos sensibilizados y macrófagos, probablemente estén mediadas por factores solubles, y son de capital importancia en el lado efector de la respuesta inmune, mediada por células.

Existe una heterogeneidad funcional considerable en las poblaciones de macrófagos, y algunas de sus propiedades no están compartidas por las células llamadas fagocitos mononucleares o macrófagos (9, 10). Como consecuencia se puede reflejar cambios mutacionales lineares en una población de monocitos o de macrófagos. En particular, las células dentríticas o células reticulares asociadas con centros germinales (5), pueden especialmente adaptarse para capturar el antígeno e interactuar con linfocitos. Estas células tienen una pronunciada capacidad para tomar al antígeno sobre su superficie en contraste con macrófagos del cordón medular o macrófagos de la cavidad peritoneal. Se piensa que puede ser más interesante la presentación de antígenos sobre la superficie que la ingestión de antígenos y su degradación enzimática. Existen pocas evidencias que impliquen que otras células fagocíticas, por ejemplo, polimorfonucleares, sean importantes para la iniciación de la respuesta inmune (5).

Una dificultad particular en el estudio de macrófagos involucrados en la respuesta inmune y de los linfocitos precursores de la célula formadora de anticuerpo, resalta al análisis microscópico de estas células, ya que algunos precursores de monocitos que permanecen en la cavidad peritoneal (10) tienen la apariencia de linfocitos, y algunas células unidas a antígeno —en la cavidad peritoneal— tienen una morfología entre monocitos y linfocitos

(11). *El empleo de un suero antimacrófago (6, 12, 14), tampoco presenta evidencias inequívocas de que ellos no dan reacción cruzada con linfocitos.*

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

La extracción de macrófagos de suspensiones de linfocitos por métodos basados en adherencia, fagocitosis o con suero antimacrófago, abate la inducción de una variedad de respuestas del antígeno. Los macrófagos exentos de linfocitos dan solamente una respuesta proliferativa débil a antígenos solubles y a células alogénicas (13, 14, 15, 16).

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

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

Una alternativa propuesta, la cual es menos fisiológica y objeto de considerables controversias, consiste en la inmunogenicidad de extractos sub-celulares de macrófagos que han tomado antígeno (5, 7). Estudios hechos por Fishman y Adler y otros (17, 19, 20), muestran que extractos de macrófagos peritoneales obtenidos 30 minutos después de la ingestión del fago T₂ fueron altamente inmunogénicos e inducían una respuesta in vitro. Se demostró que la actividad inmunogénica estaba asociada con una fracción de RNA de bajo peso molecular, sensible a ribonucleasa. Este fenómeno fue inicialmente interpretado como evidencia de la transferencia de

información genética macrófago-linfocito (17); sin embargo, estudios subsiguientes mostraron que la eficiencia de tales preparaciones probablemente estaría adscrita a la presencia de pequeñas cantidades del antígeno altamente inmunogénico (20, 21). También se demostró que el antígeno procesado por el macrófago llega a asociarse con RNA (22); esto es significativo, puesto que ocurre tanto con antígenos inmunogénicos como no inmunogénicos (23).

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

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

*La literatura señala que los macrófagos y los linfocitos T no están afectados como consecuencia de la infección con el parásito motivo de nuestro estudio (26). La inmunocompetencia de la célula T ha podido ser establecida a través de la medición de la resistencia no específica contra *Listeria monocytogenes*, en ratones infectados con *T. cruzi*. Este fenómeno debido a la activación de macrófagos es posiblemente mediado por mecanismos inmunes de tipo celular. Estudios preliminares realizados in vitro sugieren que los linfocitos sensibilizados en presencia de antígeno de *T. cruzi* producen mediadores que aumentan la capacidad bactericida de los macrófagos normales. Los resultados obtenidos indican que en efecto, los macrófagos de los animales infectados con *T. cruzi* poseen una capacidad bactericida mucho mayor que los macrófagos normales. Esto puede considerarse como evidencia de que los linfocitos T del animal, se encuentran en condiciones normales (26).*

*En cuanto al estado funcional del macrófago, se ha encontrado que animales infectados con *T. cruzi* eliminan de circulación partículas de carbón coloidal en forma más eficiente que los ratones normales, indicándonos que las células fagocíticas no están incapacitadas como consecuencia de la infección, sino, al contrario, que su actividad fagocitaria está incrementada (26).*

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

MATERIAL Y METODOS

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

Trypanosoma cruzi. La cepa mio y reticulotrópica de *T. cruzi* fue obsequiada por el doctor F. Navarrete, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal., México. Los ratones se inocularon intraperitonealmente (i. p.) con 2×10^4 tripomastigotes (51.6 LD₅₀).

Determinación de la LD₅₀ de tripomastigotes. La dosis letal de tripomastigotes necesaria para matar el 50% de ratones en un período de 30 días (LD₅₀/30 días) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (35), y fue 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.

Antígeno. 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 (i. p.) con 0.5 ml de la suspensión de eritrocitos.

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

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

Preparación de la suspensión de linfocitos de bazo. La suspensión de células linfoides se preparó presionando cada bazo sobre una malla de acero inoxidable con solución salina balanceada de Hanks (SSB). Las células se lavaron 3 veces y se resuspendieron posteriormente en el volumen deseado de SSB. La cuenta de células viables se hizo sobre una cámara de Neubauer por 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 al método descrito por Golub y col. (27). La cuenta descrita de CFA se hizo en una suspensión de células de bazo, cuatro días después de la administración del antígeno, y las células incubadas en presencia de complemento 1:10 en SSB forman placas de lisis. El número de CFA se calculó por el método de Golub y col. (27).

Tratamiento del exudado peritoneal de ratones con suero anti-tetha y anti-globulina-gamma. Experimentalmente se usaron célu-

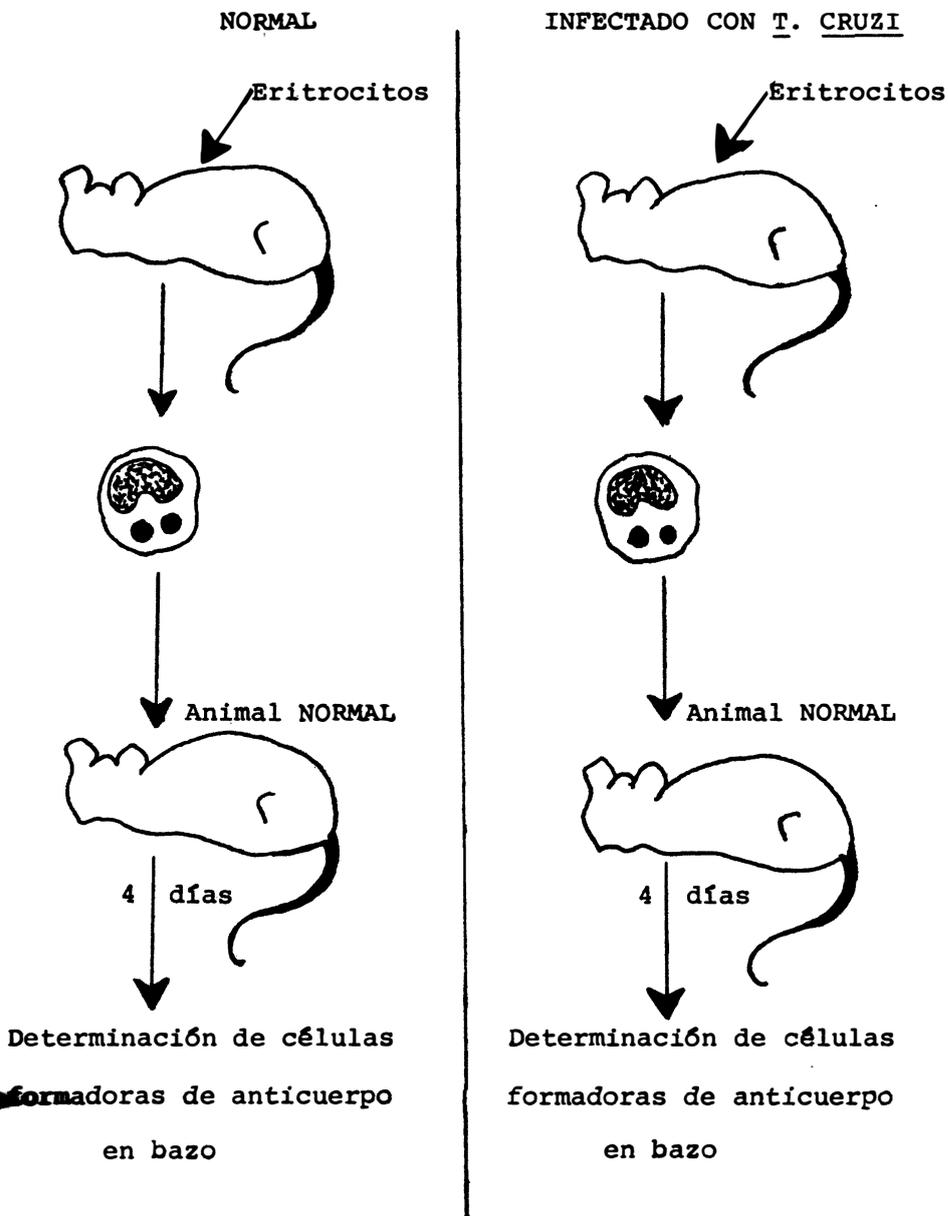


Fig. 1 Transferencia pasiva de macrófagos

las obtenidas de ratones infectados con *T. cruzi* (15 días después de la infección) y células peritoneales de ratones normales.

Las células del exudado peritoneal obtenidas 3 horas después de ser inyectados (i.p.) con eritrocitos de burro y posteriormente tratadas con cloruro de amonio y lavadas con SSB fueron purificadas con sueros anti- θ y anti-globulina- gamma. Las células se ajustaron a una concentración de 40×10^6 células/ml. (28) y se agregó suero anti- θ a una concentración final de 1:40 y de suero anti-globulina-gamma 1:50. Se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron las células 2 veces con SSB y se agregó complemento de cobayo 1:10. La mezcla se incubó con SSB y se ajustó la concentración de células viables a 10^8 células/ml. Grupos de ratones normales fueron inyectados (i.v.) con 0.1 ml de la suspensión de células así tratadas. La determinación del número de células formadoras de anticuerpos en los animales transferidos con las células peritoneales fue realizada por una modificación al método de Jerne y Nordin.

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 (29) se aplicó para estimar el significado de las diferencias principales. Cuando las varianzas fueron heterogéneas, la prueba *U* de Mann-Whitney (30) fue usada para determinar el significado de estas diferencias.

RESULTADOS

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

En la figura 2-B observamos que a partir del día 9 se presentan nidos de amastigotes en el corazón de los animales infectados con *T. cruzi*. El análisis microscópico revela un incremento de amastigotes, que aumenta hasta el día 20 del experimento, en donde su número comienza a disminuir. Asimismo, el peso del

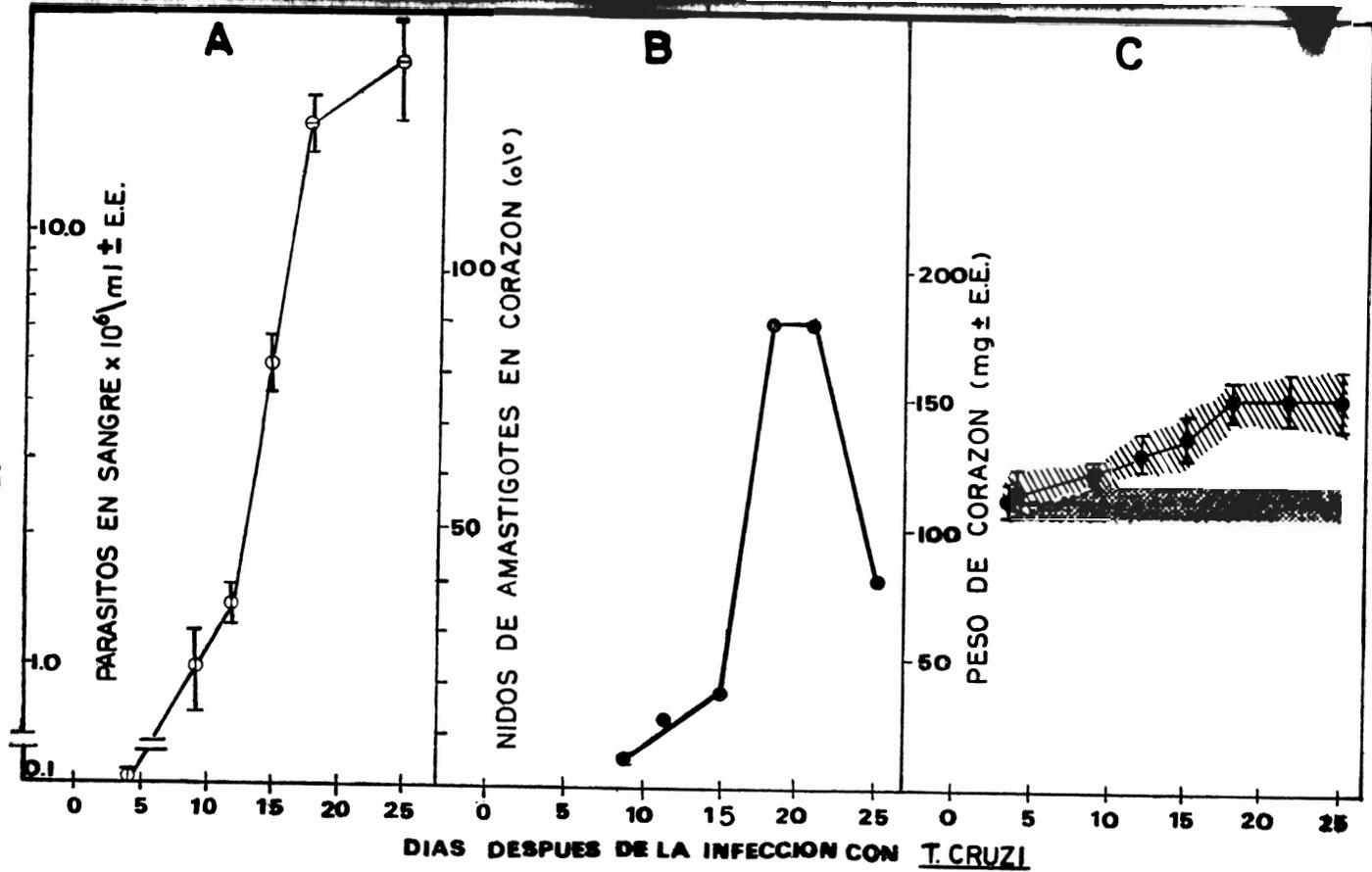


Fig. 2 Determinación del número de parásitos en animales infectados con T.cruzi

corazón, aumentó gradualmente a lo largo del experimento. La diferencia en peso observada después del día 18 de la infección, entre los animales infectados y el grupo control, fue significativa ($P < 0.01$) (Fig. 2-C).

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

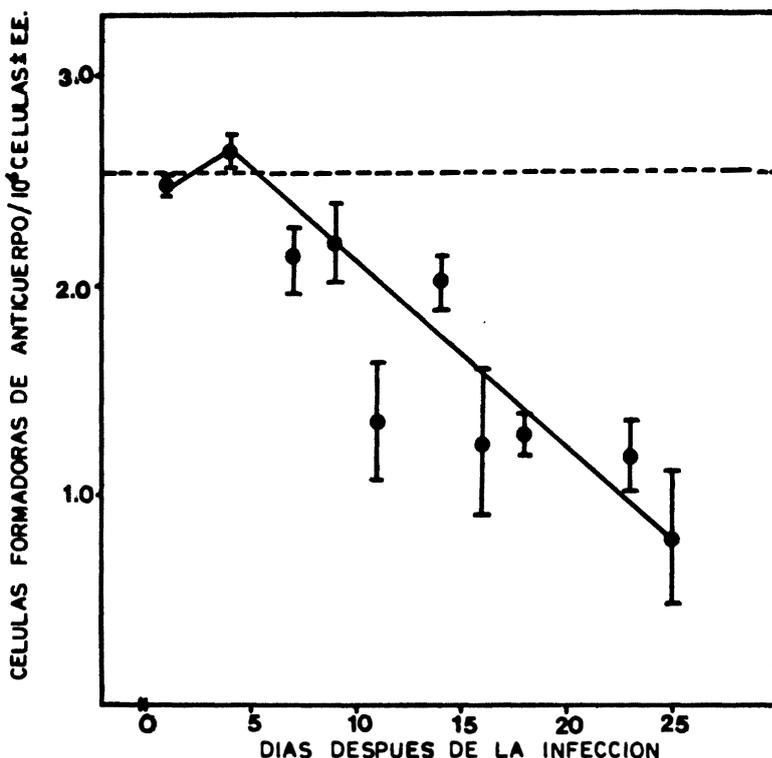


Fig. 3 Efecto de la infección con *T. cruzi* sobre la respuesta inmune primaria a eritrocitos de burro.

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

TABLA I

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

Dosis (%)	CFA/10 ⁶ CELULAS DE BAZO ± ERROR ESTANDAR		
	Normales	Infectados	P
10	10.288.2 ± 5.890.7	319.8 ± 215.4	<0.05 ^a
50	767.6 ± 357.1	18.1 ± 8.5	<0.02 ^b

^a El valor de P fue calculado de acuerdo al método de t de Student-Fisher.

^b El valor de P se calculó por el método de Mann-Whitney.

Transferencia de macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones inmunizados con eritrocitos de burro. El número de células formadoras de anticuerpo (CFA)/bazo de animales normales y de animales infectados con *T. cruzi* se esquematiza en la tabla II. Los experimentos indican que los macrófagos de animales infectados manifiestan en todos los casos mayor capacidad fagocítica a eritrocitos de burro que los animales del grupo control. Sin embargo esta diferencia solamente fue significativa en el experimento 2.

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

TABLA II

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

Donador	CFA/BAZO ± ERROR ESTANDAR		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3a
Normal	544.0±152.0	1987.3± 256.7	593.6± 33.0
Infectados con			
<i>T. cruzi</i>	747.4±264.9	8174.6±1231.0	1387.3±312.8
<i>Pb</i>	>0.05	<0.02	>0.05

a Exudado peritoneal tratado con suero anti- θ y anti-globulina antes de la transferencia.

b El valor de *P* fue calculado por comparación de grupos normales con los infectados. La prueba de *t* de Student-Fisher fue usada cuando las varianzas fueron homogéneas y la de Mann-Whitney cuando las varianzas fueron heterogéneas.

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

TABLA III

Respuesta inmune primaria de animales infectados con T. cruzi y animales normales contra eritrocitos de burro^a.

Experimento	CFA/BAZO ± ERROR ESTANDAR		
	Normales	Infectados	<i>Pd</i>
1	5627.8± 476.3	1615.9± 255.1	<0.05
2	23629.6±5180.7	2755.8±1357.8	<0.02
3 ^c	8054.2± 199.5	886.9± 77.3	<0.05

Macrófagos transferidos a ratones normales obtenidos de animales: b

Experimento	Normales	Infectados	Pd
1	544.0 \pm 152.0	747.4 \pm 264.9	>0.05
2	1987.3 \pm 256.7	8174.6 \pm 1231.0	<0.02
3 ^c	593.6 \pm 3.3	1387.3 \pm 312.8	>0.05

a Los animales infectados con *T. cruzi* recibieron 2×10^4 tripomastigotes, 15 días antes del experimento.

b Datos de la tabla I, incluidos solamente con fines comparativos.

c Exudado peritoneal tratado con suero anti- θ y anti-globulina-gamma antes de la transferencia.

d El valor de P fue calculado de acuerdo al método de t de Student-Fisher para varianzas homogéneas y con el método de Mann-Whitney para varianzas heterogéneas.

DISCUSION

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

El aumento en el grado de parasitemia en el torrente sanguíneo por tripomastigotes, lleva en el curso de la infección experimental, a la formación de nidos de amastigotes en tejidos específicos, como el corazón, produciendo miocarditis intersticial difusa, crónica e intensa, que afecta esencialmente las paredes libres de ambos ventrículos (31), y que produce aumento de peso, iniciándose, entonces, una disminución de los parásitos en el torrente circulatorio.

Una de las posibilidades para explicar la reducción en el número de células formadoras de anticuerpo contra eritrocitos de burro, es la competencia inmunológica. Sin embargo, el efecto su-

presor de la respuesta inmune en los animales infectados es aún evidenciada cuando se aumenta la concentración del antígeno considerablemente, concluyéndose que la marcada inmunosupresión causada por la infección con *T. cruzi* no es debida a un efecto competitivo del antígeno.

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

RESUMEN

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

Para probar la actividad fagocítica, nos planteamos la necesidad de demostrar que los macrófagos de animales infectados conservan la capacidad de cooperar con los linfocitos T y B en la respuesta inmune. Para ello realizamos experimentos en los cuales administramos eritrocitos de burro por vía intraperitoneal a animales infectados con *T. cruzi* y a animales normales. Posteriormente transferimos macrófagos libres de eritrocitos de burro extracelulares de estos animales a otros normales.

El exudado fue tratado con suero anti- θ y anti-globulina-gamma antes de hacer la transferencia, para eliminar la posibilidad de que la suspensión estuviera contaminada con linfocitos T y B.

La respuesta inmune de los animales transferidos se midió por medio de placas formadoras de anticuerpos. Los animales que recibieron macrófagos provenientes de animales infectados con *T. cruzi* mostraron un incremento en el número de células formadoras de anticuerpos en relación con los animales que recibieron macrófagos extraídos de animales normales.

Con los experimentos mencionados, queda bien demostrado que la lesión no se encuentra a nivel de la vía aferente de la respuesta inmune ya que tanto los macrófagos como los linfocitos T se encuentran funcionalmente normales.

Ces expériences montrent clairement que la lésion ne se trouve pas au niveau de la voie afférente de la réponse immunisante puisque tant les macrophages comme les lymphocytes T sont fonctionnellement normaux.

REFERENCIAS

1. KOBERLE, F., Chagas "disease and Chagas" syndromes. The pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6, 63, 1968.
2. GOBLE, F. C. Pathogenesis of blood protozoa, p. 237, SOULSBY, E. J. L. (Ed.). *Biology of Parasites*. Academic Press, New York, N. Y., 1966.
3. YANOVSKY, J. F., TRAVERSA, O. C., TARATUTO, A. L., GONZÁLEZ CAPPA, S. M. y PARODI, A. S., *Trypanosoma cruzi*: Experimental immunization of mice. *Exp. Parasitol.* 26, 73, 1969.
4. MARTÍNEZ, M. T., GARCÍA, W. y ORTIZ-ORTIZ, L. VI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, México, D. F., México, 1973.
5. NOSSAL, C. J. V. y ADA, G. L. Antigenes, Lymphoid Cells and the Immune Response. Academic Press, New York, 1971.
6. SCHWARTZ, R. S., RYDER, R. J. W. y GOTTLIEB, A. A. Macrophages and antibody synthesis. *Progr. Allergy*, 14, 81, 1970.
7. UNANUE, E. R. y CEROTTINI, J. C. The function of macrophages in the immune response. *Sem. Haematol.* 7, 225, 1970.
8. UNANUE, R. R. y CEROTTINI, J. C. The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages. *J. Exp. Med.*, 131, 711, 1970.
9. COHN, Z. A. The structure and function of monocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* 9, 163, 1968.
10. VAN FURTH, R. The origin and turnover of promonocytes, monocytes and macrophages in normal mice, p. 151. En VAN FURTH, R. (Ed.). *Mononuclear phagocytes*. Blackwell Oxford, 1970.
11. MANDEL, T., BYRT, P. y ADA, G. L. A morphological examination of antigen-reactive cells from mouse spleen and peritoneal cavity. *Exp. Cell. Res.* 58, 170, 1969.
12. SHORTMAN, K. y PALMER, J. The requirement for macrophages in the *in vitro* immune response. *Cell. Immunol.* 2, 399, 1971.
13. OPPENHEIM, J., LEVENTHAL, B. G. y HEREH, E. M. The transformation of column purified lymphocytes with nonspecific and specific antigenic stimuli. *J. Immunol.* 101, 262, 1968.
14. CLINE, M. J. y SWETT, V. C. The interaction of human monocytes and lymphocytes. *J. Exp. Med.* 123, 1309, 1968.
15. HERSH, E. M. y HARRIS, J. E. Macrophage-Lymphocyte interaction in the antigen induced blastogenic response of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 100, 1184, 1968.
16. SEEGER, R. y OPPENHEIM, J. J. Macrophage bound antigens I. Induction of delayed hypersensitivity and priming for production of serum antibodies in guinea pigs. *J. Immunol.* 109, 244, 1972.

17. FISHMAN, M. y ADLER, F. L. The role of macrophage-RNA in the immune response. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. *32*, 343, 1967.
18. KARTZ, D. H. y UNANUE, E. R. Critical role of determinant presentation in the induction of specific responses in immunocompetent lymphocytes. J. Exp. Med. *137*, 967, 1973.
19. FISHMAN, M. Antibody formation *in vitro*. J. Exp. Med. *114*, 837, 1961.
20. ASKONAS, B. A. y RHODES, J. M. Immunogenicity of antigen containing RNA preparation from macrophages. Nature (Lond.). *205*, 470, 1965.
21. GOTTLIEB, A. A., GLISIN, V. R. y DOTY, P. Studies in macrophage-RNA involved in antibody production. Proc. Nat. Acad. Sc. (Wash). *57*, 1249, 1967.
22. CAMPPELL, D. H. y GARVEY, J. S. Nature of retained antigen and its role in the immune response. Adv. Immunol. *3*, 261, 1963.
23. ROELANTS, F. E. y GOODMAN, J. W. Immunological studies on the poly D-glutamyl capsule of *Bacillus anthracis*, IV. The association with peritoneal exudate cells ribonucleic acid of the polypeptide in immunogenic and non immunogenic forms. Biochemistry *7*, 1432, 1968.
24. URH, J. W. y MOLLER, G. Regulatory effect of antibody on the immune response. Adv. Immunol. *8*, 81, 1968.
25. GRAF, M. W. y URH, J. W. Regulation of antibody formation by serum antibody. I. Removal of specific antibody by means of immunoabsorption. J. Exp. Med. *130*, 1175, 1969.
26. 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.
27. 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.
28. CLINTON, B. A., MAGOG, J. J. y ASPINAL, R. L. The abrogation of macrophage migration inhibition by pretreatment of immune cells with anti- θ antibody and complement. J. Immunol. *5*, 1741, 1974.
29. FISHER, R. A. Statistical methods for research workers (5 Ed.). Edinburg: Oliver y Boyd, 1934.
30. 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.
31. ORTIZ-ORTIZ, L., GONZÁLEZ, A. y LAMOYI, E. I. Comunicación personal.