

neste grupo, hemoculturas seriadas foram feitas usando método modificado, usando meio LIT (liver infusion tryptose), que consiste basicamente de lavagem e processamento rápido do sangue dos pacientes, e cultivo por até 4 meses. Hemoculturas assim processadas foram positivas em 94% dos pacientes nós tratados (Rev. Soc. Bras. med Trop, 1994) e em apenas 13% dos 146 tratados (pelo Prof. Cançado). Todos os pacientes negativos pelos testes de anticorpos líticos e/ou na ELISA com antígenos purificados foram negativos pelas hemoculturas seriadas. A clonagem e sequenciamento recentes do antígeno alvo do anticorpo lítico, a GP160, denominado icomplement regulatory protein (Norris et al. 1996) deverá permitir o uso de peptídeos sintéticos em testes mais simples e comercializáveis em "kits" facilitando o controle de cura e teste de novos medicamentos anti-*T. cruzi*. A terapêutica ambulatorial dos cerca de 20 milhies de pacientes chagasicos assintomaticos é urgente para evitar aposentadorias precoces, implantes de marca-passos, e outras cirurgias dispendiosas, considerando que a vasta maioria de pacientes são carentes e dependem do sistema público de saúde coletiva. Auxílio financeiro-CNPq (Bolsas para AUK e GK).

MR13. Algunos aspectos de la serología convencional en la fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. LUQUETTI, A.D.; TAVARES, S.B.N.; OLIVEIRA, R.A. Y RASSI, A.

Laboratorio de Pesquisa da doença de Chagas, Fac. Medicina, Universidade Federal de Goiás, POBox 1031, CEP 74001-970 Goiania, Brasil.

Mucho se ha escrito sobre la serología en la enfermedad de Chagas. En la época actual se ha dado énfasis a nuevas tecnologías, en especial con el empleo de antígenos purificados, recombinantes y péptidos sintéticos por diferentes métodos. Este hecho genera angustia en los laboratorios de rutina que nunca llegan a alcanzar la tecnología de punta, la que demanda, además de aparatos especiales, un costo siempre mayor. El motivo de esta presentación es llamar la atención para ciertos aspectos de la clásica serología convencional, utilizando antígenos totales, por las técnicas clásicamente disponibles. Presentamos resultados obtenidos con 62 sueros provenientes de pacientes en la fase aguda de la enfermedad, así como 100 sueros de pacientes crónicos, bien caracterizados clínicamente y con examen parasitológico (xenodiagnóstico) positivo en el momento de la obtención del suero. El primer aspecto se relaciona a la serología en la fase aguda, existiendo discusión sobre la frecuencia de IgM anti-*T. cruzi*. En nuestra casuística encontramos títulos de 1/5 o mayores por IFI en el 93.5 % (58/62) de los casos, lo que viene a demostrar la utilidad de esta técnica. El segundo punto se refiere a la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* durante la fase aguda. Las mejores técnicas para su detección fueron la HAI y la IFI, siendo que, con la técnica inmunoenzimática, en general obtuvimos resultados negativos con evolución de la enfermedad de hasta tres semanas. En varios pacientes fue detectada IgA anti-

T. cruzi y presencia de factor reumatoide. En relación a los sueros en la fase crónica, con xenodiagnóstico positivo, es importante resaltar que en 3/100 todas las técnicas (así como el empleo de antígenos recombinantes) fueron negativas, hecho ya conocido por los especialistas. Los restantes 97 sueros tuvieron títulos positivos por ELISA, IFI, y HAI, con títulos variables, constituyendo un perfil particular para cada paciente, de importancia fundamental para la correcta interpretación del eventual seguimiento serológico post-tratamiento. Otro aspecto fue el hallazgo de IgM anti-*T. cruzi* en los sueros de pacientes crónicos (10 %) estando asociado a veces a la presencia del factor reumatoide (FR). La IgA específica fue encontrada en el 6 % de los sueros, sin relación con FR. Por último nos gustaría llamar la atención sobre la importancia de la correcta conservación de los sueros. En diferentes experimentos constatamos pérdida sensible de anticuerpos en sueros conservados a temperaturas superiores a (-) 12°, principalmente, en ELISA e IFI. Esta disminución fue siempre menos importante en la HAI. Esta pérdida de reactividad también se aplica al uso de antígenos recombinantes. Para el seguimiento de pacientes tratados, es fundamental conservar en buenas condiciones de almacenamiento una muestra del suero original, antes del tratamiento. Este suero será el punto de partida para todo tipo de comparación, y podrá ser incluido en los experimentos cada vez que se recoge una nueva muestra. En los casos tratados durante la fase aguda, y con exámenes parasitológicos secuenciales negativos, la serología se negativiza alrededor del año hasta tres años, en nuestra experiencia. En los casos crónicos de larga evolución, verificamos la existencia de tres grupos diferentes: aquellos con exámenes parasitológicos y serológicos positivos, indicando fracaso terapéutico, los que presentan xenodiagnóstico seriado negativo con serología persistentemente positiva y aquellos con serología oscilante. Estamos estudiando un grupo de pacientes crónicos no tratados, para verificar el grado de oscilación temporal en los títulos, para una mejor interpretación de aquel último grupo. En este sentido, monitorear la presencia de anticuerpos del paciente contra determinados antígenos recombinantes o por otros métodos como la quimioluminiscencia o la lisis mediada por complemento, puede acortar el tiempo de observación. Concluimos que la clásica serología convencional, bien manejada, puede dar excelentes resultados para un correcto diagnóstico serológico. Para el seguimiento de tratados, una combinación de técnicas podría dar mejor resultado. Basta aplicar la técnica correcta para cada circunstancia.

Inmunomodulación en *T. cruzi*

MR14. Efecto de la inmunointervención sobre los niveles de citoquinas en la infección experimental. BEATRIZ BASSO.

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

Ha sido demostrado que las citoquinas regulan la iniciación y el mantenimiento de la respuesta inmune. Así-

mismo, ellas intervienen en la selección del tipo de respuesta y los mecanismos efectores que intervienen en la resistencia a los patógenos. Sin embargo, ciertas citoquinas, cuando se producen en exceso, pueden resultar perjudiciales. Es decir que todo depende del balance de citoquinas presentes en el hospedador infectado. Hasta el presente se han descrito tres tipos de células T cooperadoras: TH0, TH1 y TH2. Debido a los importantes efectos regulatorios que ejercen entre sí estas dos últimas poblaciones, como así también a la estimulación antigénica repetitiva que caracteriza a las infecciones microbianas, las enfermedades infecciosas a menudo presentan respuestas dirigidas preferencialmente hacia uno u otro fenotipo, TH1 o TH2, con la síntesis de citoquinas derivadas de cada una de ellas. Esta situación tiene profundas implicancias en la resistencia o sensibilidad a determinadas infecciones. Por ejemplo, en infecciones por *Leishmania major* y *Candida albicans* existe un predominio de la progenie TH1, que protege al huésped, resolviendo la enfermedad y, cuando predominan las citoquinas sintetizadas por TH2 la enfermedad es progresiva. En cambio, en infecciones por *Trichuris trichura* la respuesta TH2 es protectora y la TH1 inmunopatógena. Por otra parte, el shock séptico está asociado con incrementos sistémicos de citoquinas, que incluye TNF α , IL1 e IL6. El excesivo aumento de la concentración sérica de ellas induce una respuesta inflamatoria descontrolada, perjudicial para el organismo. Sin embargo, en la respuesta inmune específica estos mediadores cumplen importantes funciones en la limitación y eliminación de las infecciones, como así también en el aumento de la resistencia del hospedador.

En estudios realizados en nuestro laboratorio observamos que, en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*, existe un marcado aumento de las citoquinas pro inflamatorias como TNF α e IL6, acompañado de IFN γ e IL10, durante el periodo agudo de la infección, que llevan a la muerte del animal. Sin embargo, cuando los ratones son inmunizados con *Trypanosoma rangeli* (no patógeno para el hombre) previo al desafío con formas virulentas de *T. cruzi*, se ha observado una modulación en la síntesis y liberación de estas citoquinas, con un adecuado balance entre las mismas, cuyo resultado es la resolución de la infección. En el periodo crónico IFN γ permaneció aumentado, con normalización del resto de las citoquinas, incluida IL10. En contraste, en los animales sin inmunizar que lograron pasar a la cronicidad, los niveles de IL10 permanecieron elevados. El balance en la síntesis de IFN γ e IL10 en este esquema experimental, durante el periodo crónico, podría estar asociado con el control de la infección por parte del sistema inmune, estableciéndose un equilibrio huésped-parásito, sin consecuencias perjudiciales para el animal infectado. Así, en la Enfermedad de Chagas experimental, el balance de los mediadores inflamatorios y de las citoquinas en general estaría también relacionado con la severidad o resolución de la infección.

Un conocimiento más amplio del rol que juega la inducción o supresión de la síntesis de citoquinas por los microorganismos quizás pueda hacer posible diseños de estrategias de vacunación basados en una adecuada

modulación de citoquinas, que puedan suprimir la patología tisular asociada a la infección.

MR15. Antígenos parasitarios en la modulación de la respuesta inmune contra el *Trypanosoma cruzi*. ADRIANA GRUPPI

Inmunología Dto Bioquímica Clínica - Fac Cs Químicas - UNC - Agencia Postal 4 CC 61 5000 Córdoba. E-mail: agruppi@bioclin.uncor.edu

La fase aguda de la infección con *Trypanosoma cruzi* cursa con una importante activación policlonal de linfocitos T y B coexistente con inmunosupresión. Estos fenómenos representan una estrategia del parásito para invadir al huésped. La infección con *T. cruzi* produce activación de clones de linfocitos B específicos para el parásito como así también una indiscriminada activación de otros clones con la consecuente producción de anticuerpos específicos para el *T. cruzi* y para otros antígenos, algunos de los cuales pueden ser componentes del huésped. Uno de los desafíos del estudio de la enfermedad de Chagas es la identificación de antígenos parasitarios y de componentes del sistema inmune que participan en la inducción de activación policlonal, como así también conocer los mecanismos que permitan explicar la coexistencia de activación policlonal e inmunosupresión.

Hemos observado que una fracción antigénica de pl 7-9 obtenida del citosol de epimastigotes del *T. cruzi* (denominada FI) induce la proliferación y diferenciación de células B murinas normales. FI es capaz de expandir proporcionalmente las dos subpoblaciones de linfocitos B: CD5+ y CD5-. La inmunoglobulina predominantemente producida por las células B estimuladas con FI, luego de 6 días de cultivo, fue IgM reactiva con actina, mioglobina, miosina, anhidrasa carbónica y tiroglobulina, pero no con FI. Además, hemos detectado un incremento de IgG1 y no se detectaron modificaciones en los niveles de IgG2 e IgG3. Este perfil de anticuerpos se correlacionó con los niveles y tipos de citoquinas detectadas, por ELISA, en los sobrenadantes de cultivo de las células estimuladas con FI como: IL-4, IL-10, IL-6 e IFN γ . No se detectó IL-2. La ausencia de IL-2 se correlaciona con la falta de proliferación de linfocitos T luego del estímulo con FI. Estudiamos comparativamente la respuesta de CMB de ratones infectados con tripomastigotes (Tp) del *T. cruzi* (Tulahuén) frente a FI. La respuesta linfoproliferativa frente a FI fue significativamente disminuida respecto de sus controles normales. En función de estos resultados y para tratar de dilucidar los eventos que permitan explicar la coexistencia de activación policlonal e inmunosupresión, analizamos la respuesta de CMB de ratones infectados con dosis de 500 a 100000 parásitos, obtenidas a distintos tiempos postinfección (pi), frente a mitógenos de células T (ConA) y células B (LPS). Las CMB de los animales infectados con mayor número de Tp tanto en el día 8 u 11 pi presentan una respuesta linfoproliferativa basal y frente a mitógenos muy disminuida, desde las 24 hs de cultivo, que se correlaciona con la presencia de células activadas, agregadas, con características de inmadurez y fragmentación de DNA. En cambio, en el día 8

pi la proliferación basal de CMB de animales infectados con bajas dosis de Tp está aumentada y el pico de activación es precoz respecto de los animales normales. Esta cinética de respuesta acelerada nos lleva a detectar supresión en los tiempos (3 días de cultivo) habitualmente estipulados para medir proliferación frente a estos mitógenos. Estos resultados nos indican que bajas parasitemias inducen cierto grado de activación en los linfocitos que les permiten proliferar espontáneamente y responder precozmente a un mitógeno; mientras que en los animales infectados con mayor número de parásitos las células se sobreactivan in vivo perdiendo la capacidad de proliferar; probablemente debido a una muerte celular programada (apoptosis) inducida por activación. Esta eliminación de clones, nos permitiría explicar la desaparición de la población de anticuerpos reactivos con FI que se observa durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, pero que está presente en la fase aguda de la misma (Zúñiga y col 1996, Reunión Anual SAPYEP). Abrahamsohn y col (1995, J Immunol 155(8)3955) demostraron que la falta de respuesta producida durante la fase aguda de la infección con el *T. cruzi* se debe a una gran producción de óxido nítrico como así también a una disminución en la expresión de antígenos clase II del MHC sobre macrófagos. Trabajos recientes (Cell Immunol 178(1)1,1997; Cancer Res 57(10)1823,1997; J Immunol 158(10)4696,1997) demuestran que el óxido nítrico es capaz de actuar sobre los linfocitos conduciéndolos a la apoptosis.

Estos datos analizados en conjunto nos sugieren que durante la fase aguda de la infección con el *T. cruzi* se produce una importante activación policlonal producida, entre otros elementos, por antígenos parasitarios mitogénicos y que, cuando estas células activadas se encuentran nuevamente con el antígeno o mitógenos no parasitarios son capaces de ir a la apoptosis ya sea a través de una muerte celular inducida por activación o por factores solubles liberados durante el proceso de activación.

MR16. TNF- α in murine *Trypanosoma cruzi* infection.

Y. CARLIER¹, C. TRUYENS¹, F. TORRICO¹, A. ANGELO-BARRIOS¹ and W. BUURMAN².

¹University of Brussels (Belgium) and ²University of Limburg (Maastricht, The Netherlands).

High levels of circulating TNF protein (monitored by ELISA) were found in male BALB/c mice acutely infected with *T. cruzi*, paralleling the kinetics of parasitaemia, though circulating bioactive TNF (monitored using Wehi cell bioassay) was not detected. Indeed, the plasma of acutely infected mice displayed high amounts of sTNF-R1 and II and of inhibitory activities against bioactive standard TNF (Wehi cell bioassay), indicating a possible neutralization of TNF biological activity by sTNF-R in blood.

Since circulating levels might not reflect the tissular situation, the productions of TNF and TNF-R were also studied in peritoneal and spleen macrophages harvested from *T. cruzi* infected mice. Though both TNF-R were detected, bioactive TNF could be also found in the

supernatants of cells collected during the acute phase of infection. LPS-stimulation of such cells increased the production of bioactive TNF without effect on that of TNF-RII, indicating that the macrophages of *T. cruzi*-acutely infected mice produced bioactive TNF and were primed for such production.

The role of endogenously produced bioactive TNF was studied by injecting TNF-neutralizing mAb (TN3), during the first 2 weeks of infection. Whereas this treatment reduced the levels of circulating TNF, parasitaemia and mortality of mice were considerably increased. The cachexia associated to the acute *T. cruzi* infection in mice (characterized by a weight loss of 20% mainly due to a body fat depletion) was also reduced by half after administration of TNF-neutralizing mAb.

Altogether, these results suggest that *T. cruzi* infection modulates the biological activity of endogenous TNF by regulating the production of sTNF-R and that the bioactive TNF available in vivo has a protective role against *T. cruzi* infection as well as a detrimental effect in inducing cachexia in mice.

MR17. Inmunopatología asociada a la expresión de moléculas de adhesión. SUSANA A. LAUCELLA.

Instituto Nacional de Parasitología, Dr. Mario Fatala Chabén, Av. Paseo Colón 568, 1063 Buenos Aires.

Uno de los aspectos característicos de la forma crónica de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de una cardiomiopatía inflamatoria persistente que puede culminar en una insuficiencia cardíaca y muerte. En la génesis de la lesión inflamatoria, la interacción entre células inmunocompetentes, el endotelio, la matriz extracelular y los tejidos blancos serían importantes en la evolución de la enfermedad. El reconocimiento de antígenos del parásito por el sistema inmune del huésped resulta en la liberación de citoquinas y otros mediadores inflamatorios que juegan un papel preponderante en la activación de los mecanismos efectores tripanocidas pero que podrían también crear el medio adecuado para el desarrollo de la patología. Una de las formas en que actúan estos mediadores inflamatorios es regulando los niveles de distintas moléculas de adhesión celular (MAC). En el sistema inmune, las MAC controlan la interacción celular requerida para la activación de linfocitos por antígenos extraños, y dirigiendo la migración y localización de leucocitos hacia los sitios de inflamación. Se han aislado también formas solubles de varias MAC cuya liberación es afectada por los mismos estímulos que inducen la expresión de las formas celulares. La importancia de las MAC en la enfermedad de Chagas se sustenta en diversa evidencia experimental. Durante la etapa aguda de la infección murina con distintas cepas del *Trypanosoma cruzi* hemos demostrado que la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) es inducida en miocardiocitos en forma paralela a la acumulación de linfocitos infiltrantes y citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1). Asimismo, los niveles solubles (s-ICAM-1) se encuentran aumentados en el suero. Estos resultados sugieren la