

## RESPUESTA TH1 EN LA INFECCION EXPERIMENTAL CON *TRYPANOSOMA CRUZI*

RITA L. CARDONI\*, MARIA INES ANTUNEZ, ANALIA A. ABRAMI

Instituto Nacional de Parasitología Dr. M. Fatała Chabén (INP), ANLIS Dr. C.G. Malbrán, Buenos Aires

**Resumen** En el huésped infectado con *Trypanosoma cruzi*, la respuesta inmune protectora involucra principalmente la producción de anticuerpos específicos y la activación de células fagocíticas por interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). El efecto central del IFN- $\gamma$  *in vivo* sería la activación de la sintetasa inducible de óxido nítrico de macrófagos (iNOS) y la generación de óxido nítrico (NO $^{\circ}$ ) que participa en la destrucción intracelular de los parásitos. En la infección aguda, la inducción de la respuesta TH1 sería llevada a cabo por la interleuquina 12 (IL-12), que estimula la producción de IFN- $\gamma$  en células NK. En la liberación de IFN- $\gamma$  también intervienen otros tipos de células, como los linfocitos Thy-1 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ , CD4 $^+$  y CD8 $^+$ . El control de la respuesta TH1, podría ser, en parte, el resultado de la menor activación de macrófagos, por la disminución de la carga parasitaria, y de la producción de IL-10 y del factor de transformación del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). La respuesta protectora TH1 también estaría implicada en el daño tisular y en las alteraciones de la respuesta inmune observadas durante la infección. Nosotros estudiamos la cinética de la actividad NK y de la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  por células de bazo, así como los niveles séricos de estas citoquinas centrales de la respuesta TH1, en ratones BALB/c y C3H infectados con *T. cruzi*, cepa Tulahuén. Inmediatamente después de la infección encontramos que, en las células de bazo, incrementó tanto la producción de IL-12 como la actividad NK, y este efecto fue mayor en ratones C3H que en BALB/c. En los C3H, el IFN- $\gamma$  aumentó simultáneamente, a diferencia de los BALB/c en los que la citoquina incrementó más tardíamente en la fase aguda. En ambas cepas, la infección indujo muy rápidamente altos niveles séricos de IL-12 que se mantuvieron elevados durante toda la fase aguda. Por otro lado, el IFN- $\gamma$  sérico incrementó unos días antes del pico de parasitemia y alcanzó mayor concentración, y más tempranamente, en los ratones BALB/c que en los C3H. Para nuestra sorpresa, en la fase crónica de la infección, la producción de IL-12 seguía alta en ambas cepas, a pesar de ello, el IFN- $\gamma$  sólo continuó elevado en los ratones BALB/c. Aunque en la fase aguda la respuesta global fue predominantemente TH1 en las dos cepas de ratones, los BALB/c tienen una mayor susceptibilidad que los C3H. El control inicial del parásito parecería estar más relacionado con la expresión de la respuesta TH1 a nivel de células del bazo, mientras que los niveles séricos de IL-12 e IFN- $\gamma$  podrían estarlo con la inducción del daño tisular. Nuestras observaciones indicarían que la respuesta protectora TH1 tendría diferente modalidad en diferentes relaciones huésped-parásito, y que los factores que la controlan son de importancia primaria para determinar la expresión cuali- y cuantitativa de la relación IL-12/NK/IFN- $\gamma$  y su participación en la resistencia y en el daño tisular.

**Abstract** *TH1 response in the experimental infection with Trypanosoma cruzi.* Specific antibodies and the activation of phagocytic cells by IFN- $\gamma$  are the key elements of the immune response involved in protection of the *T. cruzi* infected host. The central role of the IFN- $\gamma$  *in vivo* seems to be the activation of the inducible nitric oxide synthetase of macrophages (iNOS) and the production of nitric oxide (NO $^{\circ}$ ) for the intracellular destruction of the parasite. Interleukin 12 (IL-12), the cytokine that stimulates NK cells for IFN- $\gamma$  production, seems to trigger the TH1 response in the acute phase. Other cell types, such as lymphocytes Thy-1 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ , CD4 $^+$  and CD8 $^+$ , are also involved in IFN- $\gamma$  production. The down regulation of the TH1 response could in part depend on the decrease in the macrophage activation, as a result of the controlled parasite burden, and on the production of IL-10 and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). The protective TH1 immune response seems to be also related to both the tissue damage and the alterations of the immune response observed during the infection. We studied the kinetics of both NK cell activity, and the production of IL-12 and IFN- $\gamma$  by spleen cells, as well as the seric levels of these cytokines, in BALB/c and C3H mice infected with *T. cruzi*, Tulahuén strain. In the spleen, we found that the production of IL-12 and the NK cell activity increased in the very early acute infection, and that in C3H the effect was higher than in BALB/c mice. IFN- $\gamma$  increased in C3H at the same time, but in the BALB/c strain it increased later in the acute phase. The infection induced a very early increase in the seric levels of IL-12, that remained high throughout the acute phase, in both mouse strains. However, the levels of IFN- $\gamma$  in the serum increased a few days before the peak of parasitemia, reaching higher values, and earlier, in BALB/c than in C3H mice. Surprisingly, in the chronic infection IL-12 production remained high in both mouse strains, but IFN- $\gamma$  production was only observed in BALB/c mice. The immune response was predominantly TH1 in both mouse strains, in spite of the higher susceptibility of BALB/c compared to C3H. The early control of the parasite burden could be evaluated as the expression of the TH1 response in spleen cells, while the seric levels of IL-12 and IFN- $\gamma$  would be related to the induction of tissue damage. Our data indicate that the protective TH1 immune response has a different expression according to the host-parasite relationship, and that the factors controlling the response are of primary importance to determine the quali- and quantitative expression of IL-12/NK/IFN- $\gamma$  as well as their involvement in resistance and tissue damage.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, IL-12, IFN- $\gamma$ , NK activity

\*Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica)

En nuestro país, la alta prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi*, asociada a la alta densidad de población en la zona endémica, constituye un serio problema sanitario<sup>1</sup>. Esto se debería, paradójicamente, a que a pesar de la buena adaptación del *T. cruzi*, reflejada en el bajo porcentaje de los infectados que desarrollan sintomatología clínica, existe un gran número de individuos crónicamente infectados<sup>1, 2</sup>.

La resistencia a la infección con *T. cruzi* ha sido asociada con la mayoría de los mecanismos inmunes efectores conocidos, que fueron estudiados principalmente en modelos experimentales en los que los ratones desarrollan altas parasitemias. En estos casos, los principales mecanismos efectores para el control del parásito en la etapa aguda serían los anticuerpos específicos<sup>3</sup>, dependientes de linfocitos T CD4<sup>+</sup> 4, y el incremento de la actividad tripanocida de células fagocíticas por IFN- $\gamma$ <sup>5, 6</sup>. Esta citoquina induce la activación de la iNOS con el consecuente incremento de NO<sup>o</sup>. En presencia de IFN- $\gamma$ , la coestimulación de macrófagos por otros mediadores, como el factor necrosante de tumores  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>8</sup> y el factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)<sup>9</sup>, produce un incremento adicional de la producción de NO<sup>o</sup> y de la destrucción intracelular de los parásitos. La deficiencia en la expresión de iNOS o del receptor para el IFN- $\gamma$  impide la sobrevivencia del huésped infectado con *T. cruzi*<sup>10</sup>.

La respuesta inmune adquirida a infecciones se considera TH1 o TH2 de acuerdo al perfil de citoquinas que se produce preferentemente. La respuesta TH1 se caracteriza por la liberación de IL-2, IFN- $\gamma$  y linfotóxina (o TNF- $\beta$ ), mientras que IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 están asociadas con la respuesta TH2<sup>11</sup>. La IL-12 induce la producción de IFN- $\gamma$  por células NK, en la respuesta no-adaptativa, así como por células T para el desarrollo de la respuesta TH1 específica<sup>12</sup>. En la infección con *T. cruzi*, esta citoquina es liberada durante la fagocitosis o la invasión de monocitos/macrófagos por el parásito<sup>13</sup>. Otras citoquinas, como la IL-15<sup>14</sup> y la IL-18<sup>15</sup> también están involucradas en la activación de células NK y en la producción de IFN- $\gamma$ , pero en nuestro conocimiento, aun no ha sido evaluada su actividad biológica en la infección con *T. cruzi*.

En la etapa aguda de la infección se detecta muy tempranamente un incremento de los niveles del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para IL-12 e IL-18 en el bazo<sup>15</sup> y se observa globalmente una respuesta TH1 con producción de IFN- $\gamma$ <sup>16, 17</sup>, activación de macrófagos<sup>18</sup> y predominio, T-dependiente, de anticuerpos IgG2a sobre IgG1<sup>19</sup>. La administración de anticuerpos anti-IL-12 incrementa la susceptibilidad a la infección, indicando que esta citoquina se produce *in vivo* y juega un papel en la resistencia<sup>13, 20</sup>. Además, el tratamiento con IL-12 *in vivo* disminuye la parasitemia y la mortalidad, y este efecto depende de la subsecuente activación de la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ <sup>20</sup>.

Aún no se conoce claramente la regulación de la síntesis de IFN- $\gamma$  que desencadena una respuesta preponderantemente TH1 en la fase aguda de la infección. La producción de IFN- $\gamma$  podría ser el resultado de la activación de las células NK<sup>21</sup>, Thy-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y, en menor medida, T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> 16 por la IL-12. La liberación de IFN- $\gamma$  sería la base de la protección ejercida en la infección por células NK y T CD8<sup>+</sup> 4, 22. La inhibición de la producción de IL-2, así como de la expresión de su receptor<sup>23</sup>, podría explicar la falta de evidencias claras sobre la producción de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> en las etapas iniciales de la infección.

La respuesta TH1 que protege al huésped de la infección también podría estar relacionada con el daño tisular observado en la etapa aguda, ya que involucra, o se acompaña, de una activación generalizada de células inmunocompetentes y del incremento en la producción de mediadores inflamatorios, como IL-12 e IFN- $\gamma$ , que podrían estar implicados en el daño tisular<sup>24, 25, 26</sup>. En el huésped infectado con *T. cruzi*, la administración de IL-12 exacerba la reacción inflamatoria tisular, con el consecuente incremento de la mortalidad, mientras que ocurre el efecto inverso con la administración de anticuerpos anti-IL-12<sup>27</sup>. En la fase aguda de la infección se detectó la producción de IL-1<sup>28</sup>, IL-6<sup>29</sup> y TNF- $\alpha$ <sup>30</sup>, citoquinas proinflamatorias que inducen en hígado la síntesis de proteínas de fase aguda<sup>31</sup>, y éstas se encuentran incrementadas en el suero, acompañando a los niveles altos de parasitemia<sup>29, 32</sup>. En la infección con *T. cruzi*, a semejanza de lo que ocurre en la mayoría de las infecciones, el TNF- $\alpha$  en bajas concentraciones actúa sinérgicamente con el IFN- $\gamma$  en la protección contra el parásito, mientras que si alcanza altos niveles actúa en detrimento del huésped, incrementando la reacción inflamatoria tisular<sup>8, 31</sup>. Esto se evidencia claramente en ratones transgénicos para el receptor soluble de TNF- $\alpha$ , donde la citoquina es neutralizada *in vivo*. En este modelo incrementa la susceptibilidad a la infección a pesar de la disminución de los infiltrados inflamatorios tisulares en el corazón<sup>33</sup>.

El control de la producción de IFN- $\gamma$  y de la respuesta TH1 en las etapas tardías de la infección podría deberse a la disminución de la estimulación de los macrófagos, como resultado de la declinación del número de parásitos, así como a la presencia de glucocorticoides, TGF- $\beta$ , citoquinas TH2, como la IL-10, o bien al exceso de los mismos mediadores involucrados en la respuesta TH1, como el NO<sup>o</sup> y prostaglandinas.

Si bien en la etapa aguda predomina la respuesta TH1, también incrementan los niveles séricos de IgE<sup>34</sup> y se observa la producción de citoquinas relacionadas con la respuesta TH2, como la IL-10<sup>35</sup>. Esta tendría un papel crítico como regulador del balance entre el efecto protector y la inducción del daño tisular de la respuesta TH1 en la infección con *T. cruzi*. La IL-10, aunque disminuye

la protección conferida por el IFN- $\gamma$ , previene el desarrollo de la patología T-dependiente y la activación de células T CD4<sup>+</sup> asociada a la sobreproducción de IFN- $\gamma$  e IL-12<sup>36</sup>.

A diferencia de lo observado en Leishmaniasis donde, en una misma cepa de ratones, la producción de IL-10 y de IFN- $\gamma$  se excluyen mutuamente<sup>37, 38</sup>, en la infección con *T. cruzi* no hay aun evidencias experimentales claras de que los parásitos infectivos puedan inducir en el huésped inmunocompetente una polarización tan marcada hacia una respuesta TH2, como en Leishmaniasis<sup>39, 40</sup>. Esto podría estar relacionado con la diferencia en la fuente de IFN- $\gamma$  e IL-10 en ambas infecciones. Tanto en los individuos normales como en los infectados con *L. major*, los principales productores del IFN- $\gamma$  y de IL-10 en el bazo son los linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>37</sup>. En cambio, en la infección con *T. cruzi*, el IFN- $\gamma$  proviene principalmente de células NK<sup>21, 39</sup> y Thy<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup><sup>16</sup>, mientras que la IL-10 es producida por macrófagos y por linfocitos B y T<sup>36, 39</sup>. La regulación de la respuesta TH1/TH2 ha sido estudiada en las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, pero no se conoce claramente cómo se regulan cuando éstos no intervienen predominante-mente, como ocurre en la infección con *T. cruzi*. Las citoquinas TH2, que en Leishmaniasis estarían asociadas a la susceptibilidad<sup>38</sup>, podrían actuar como moduladoras de la respuesta TH1 en la infección con *T. cruzi*.

El TGF- $\beta$  sería otro importante modulador de la respuesta TH1. En la infección con *L. major*, la producción temprana de TGF- $\beta$  determina la susceptibilidad, ya que la IL-12 necesaria para la inducción de la respuesta TH1 se produce tanto en el huésped resistente como en el susceptible<sup>38</sup>. En cambio, en la infección con *T. cruzi*, las células productoras de TGF- $\beta$  se encuentran en el bazo de ratones susceptibles y resistentes, tanto en la fase aguda como crónica de la infección<sup>41</sup>. Además, la administración *in vivo* de TGF- $\beta$  incrementa la parasitemia y la mortalidad que, a diferencia de lo que ocurre en Leishmaniasis, se observa tanto en ratones susceptibles como resistentes a la infección<sup>42</sup>.

*In vivo*, la IL-10 y el TGF- $\beta$  podrían disminuir la activación de células fagocíticas, como reflejo de su capacidad inhibidora de la destrucción intracelular de *T. cruzi* *in vitro* en macrófagos activados<sup>6</sup>. De esta forma, a pesar de disminuir la destrucción del parásito, limitarían el daño tisular causado por los mediadores de macrófagos activados (Fig. 1).

Nosotros estudiamos la respuesta TH1 en ratones BALB/c y C3H inoculados con igual dosis de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Tulahuén. Evaluamos los niveles séricos de IL-12 y de IFN- $\gamma$ , así como la producción de estas citoquinas y la actividad NK en células del bazo, que es el órgano linfático periférico que juega un importante papel en la eliminación de los parásitos<sup>44</sup>. En la fase aguda, los ratones BALB/c son más

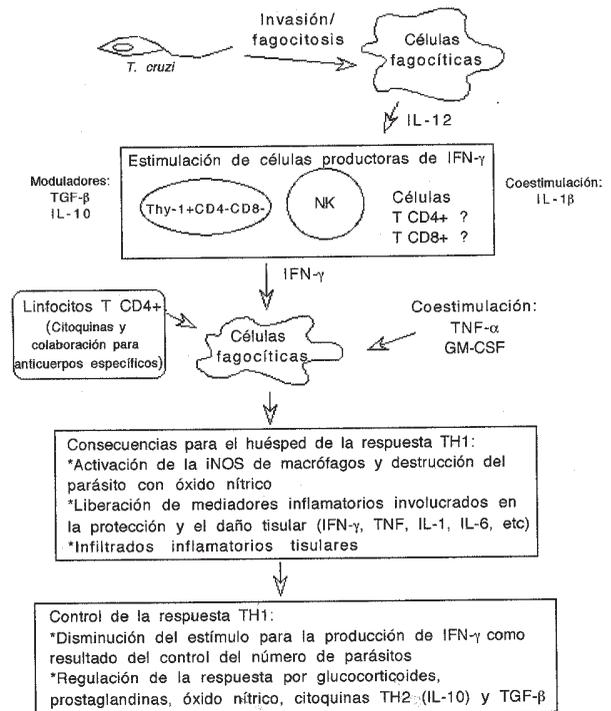


Fig. 1.— Diagrama que indica en forma aproximada los niveles en los cuales actúan la IL-1 $\beta$ <sup>43</sup>, el TGF- $\beta$ <sup>42</sup>, la IL-10<sup>21</sup>, el TNF- $\alpha$ <sup>8</sup> y el GM-CSF<sup>9</sup> en la regulación de la respuesta inmune en la etapa aguda de la infección.

susceptibles (mayor mortalidad y parasitemia), mientras que los C3H tienen mayor susceptibilidad al daño tisular en la fase crónica de la infección<sup>45</sup>. Si bien la parasitemia no se detecta hasta el día 12 post-infección (pi), los parásitos llevan adelante su ciclo de multiplicación activa e invasión célula a célula desde los primeros días de la infección y su ARNm ha sido detectado en el bazo desde los 3 días pi<sup>15</sup>.

### Respuesta no-adaptativa TH1 en el bazo de los ratones BALB/c y C3H

En el bazo de ambas cepas, la máxima producción espontánea de IL-12 ocurrió en la primera semana pi, acompañando a la activación policlonal temprana de la fase aguda<sup>46</sup>, y los niveles alcanzados fueron mayores en la cepa C3H que en la BALB/c (Fig. 2). También fueron altos los niveles de ARNm de IL-12 p40 encontrados en el bazo en un modelo experimental similar<sup>15</sup>. Al mismo tiempo aumentó la actividad NK, en forma proporcional a los niveles de IL-12 (Fig. 2). En este momento, la liberación espontánea de IFN- $\gamma$  sólo incrementó significativamente en la cepa C3H. Por su parte, las células del bazo de los BALB/c aumentaron la producción espontánea de IFN- $\gamma$  a las 2 semanas pi, coincidiendo con un segundo pico de actividad NK en esta cepa. En ambas cepas, cuando las

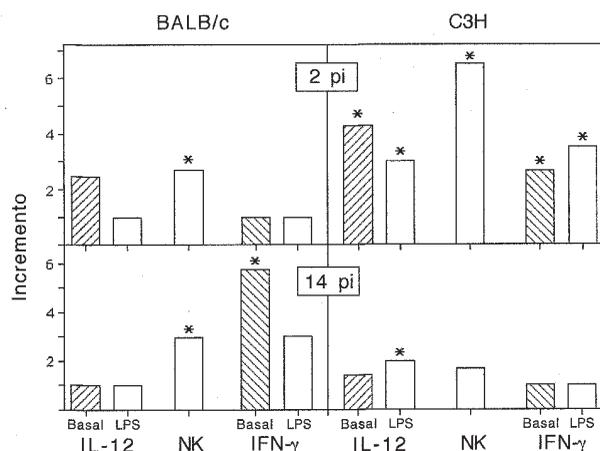


Fig. 2.— Incremento (expresado en veces sobre el control no infectado) de la producción de IL-12 p40 y de IFN-γ, así como de la actividad NK en el bazo de ratones BALB/c y C3H en dos tiempos de la fase aguda de la infección. Para las citoquinas, se indican los valores basales o con estimulación con lipopolisacárido (LPS) . \* Las diferencias con el control son estadísticamente significativas (p < 0.05, t de Student).

células de bazo se estimularon *in vitro* con lipopolisacárido sólo hubo un cambio cuantitativo, pero no cualitativo, en el perfil de producción de IFN-γ<sup>47</sup>.

Los mecanismos que controlan la proliferación temprana del parásito, en la primera semana de la infección, son de importancia primaria en la resistencia del huésped<sup>48</sup>. En la infección con *T. cruzi*, el control inicial sería llevado a cabo por el IFN-γ proveniente de células NK<sup>21</sup>. Los C3H, genéticamente con mayor actividad NK<sup>49</sup>, son mejores productores de IFN-γ que los BALB/c en los momentos iniciales de la infección, y ésta podría ser la base de su mejor performance durante la fase aguda.

El papel central del IFN-γ en el control de la infección con *T. cruzi* es de gran importancia en la fase muy temprana, antes de que se alcancen altas parasitemias. En esta etapa se pone en evidencia tanto el incremento de susceptibilidad por la administración de anticuerpos anti-IFN-γ<sup>21, 50</sup>, como la protección conferida por la administración de IFN-γ exógeno<sup>51</sup>. Durante los primeros días se puede detectar la producción de IFN-γ *in vitro* en las células del huésped por la presencia del ARNm o la producción de la proteína<sup>21, 35, 40</sup>, pero los niveles sistémicos son todavía insuficientes para detectarlo en suero.

El retardo en la producción de IFN-γ en el bazo de los ratones BALB/c podría deberse a un nivel insuficiente de IL-12, a la ausencia de cofactores eventualmente necesarios para la respuesta (IL-15, IL-18, etc), a la producción temprana de citoquinas que controlan su producción (TGF-β, IL-4, IL-10, IL-13, etc), o bien a la baja acti-

vidad NK característica de esta cepa<sup>49</sup>. Todavía no fue dosada *in vivo* la actividad biológica de IL-12 en la infección con *T. cruzi*. Nosotros evaluamos los niveles de IL-12 p40, subunidad de la IL-12 incluida en la proteína p70 biológicamente activa, y se conoce que si la p40 es producida en exceso, podría inhibir a la p70<sup>52</sup>.

La respuesta podría requerir de otras citoquinas, como la IL-15 e IL-18. Estas citoquinas, al igual que la IL-12, son producidas por células fagocíticas y promueven la sobrevivencia y la producción de IFN-γ en células NK, pero difieren de la IL-12 en su estructura y en el mecanismo de estimulación de la respuesta TH1<sup>14, 15</sup>.

La IL-13 tiene una actividad biológica similar a la IL-4<sup>53</sup>, pero no se ha determinado aun su papel en la infección con *T. cruzi*. En caso de ser producida, podría compensar la falta de IL-4 en la fase aguda de la infección, que no se encontró en el suero<sup>15, 54</sup> ni en el sobrenadante de células de bazo, aun luego de la estimulación *in vitro* con antígenos del parásito<sup>40, 55</sup>.

### Niveles séricos de IL-12 e IFN-γ en los ratones infectados

Encontramos que los niveles de IL-12 p40 incrementaron muy tempranamente en el suero en ambas cepas (Fig. 3) y que se mantuvieron altos durante todo el curso de la infección. Las concentraciones de IL-12 alcanzadas son del orden de las encontradas cuando se inocula un superantígeno *in vivo*<sup>56</sup>. En ambas cepas, a pesar del rápido incremento de IL-12 p40, el IFN-γ sérico recién aumentó a las 2 semanas de la infección; en este momento los BALB/c presentaron los niveles máximos de la citoquina, aproximadamente una semana antes del pico de parasitemia (Fig. 3). La disminución del IFN-γ antes del pico de parasitemia también fue observado en otros modelos experimentales similares<sup>54, 55</sup>. En los C3H los niveles séricos de IFN-γ fueron significativamente menores que en los BALB/c, con una cinética en forma de meseta de aproximadamente dos semanas.

Estos altos niveles séricos de IFN-γ en las etapas tardías de la fase aguda no estarían relacionados con la resistencia a la infección, ni en nuestro caso ni en otros modelos experimentales<sup>16, 54</sup>. Sin embargo, este incremento de los niveles de IL-12 e IFN-γ podría tener importantes consecuencias a nivel sistémico en el huésped infectado. El IFN-γ es una citoquina pro-inflamatoria que induce la expresión de moléculas de Clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad y de moléculas de adhesión intercelular en muchos tipos celulares, así como la activación de células fagocíticas, asociada a la liberación de mediadores potencialmente nocivos para el huésped<sup>31</sup>, como las especies reactivas del oxígeno<sup>57</sup>. Así, los altos niveles de IFN-γ podrían contribuir a localizar infiltrados inflamatorios fuera de los órganos linfáticos

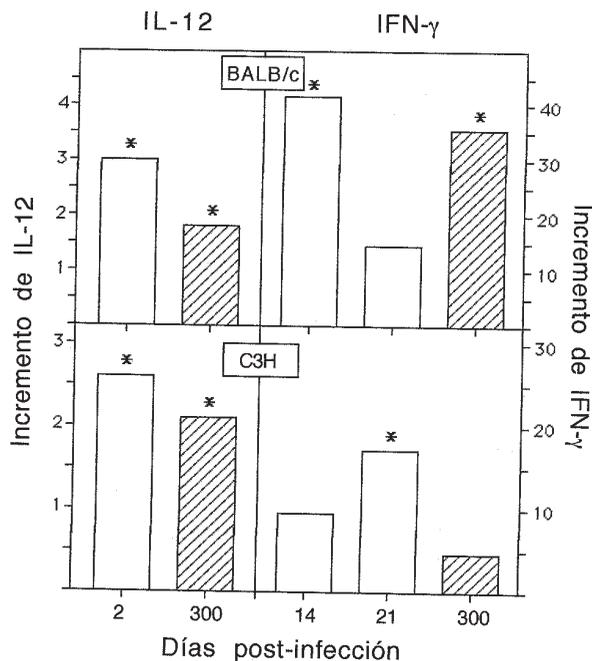


Fig. 3.— Incremento (expresado en veces sobre el control no infectado) de los niveles séricos de IL-12 p40 y de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c y C3H en la fase aguda (□) y crónica (▨) de la infección. \* Las diferencias con el control son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ,  $t$  de Student).

periféricos, o bien a la activación de aquellos ya establecidos.

Los elevados niveles de NO<sup>o</sup> encontrados en la fase aguda, como resultado de la activación de la iNOS por el IFN- $\gamma$ , no parecen contribuir al daño tisular en la infección con *T. cruzi*, ya que el tratamiento con inhibidores específicos de la iNOS no afecta la extensión de los infiltrados inflamatorios en corazón y músculo<sup>58</sup>. Más aun, en ciertas condiciones, el NO<sup>o</sup> parece proteger de los efectos pro-inflamatorios del IFN- $\gamma$ <sup>59</sup>.

### IL-12 e IFN- $\gamma$ en la etapa crónica de la infección

En la etapa crónica, los niveles séricos de IL-12 p40 continuaron altos en ambas cepas, y fueron similares a los observados en la fase aguda (Fig. 3). Esto nos sorprendió, ya que actualmente se piensa que la IL-12 está relacionada con la respuesta inicial no-específica a las infecciones<sup>31</sup>. Sin embargo, como el parásito persiste de por vida en los tejidos de los ratones de ambas cepas, la presencia continua del estímulo parasitario podría explicar el mantenimiento de los altos niveles de IL-12 en la fase crónica.

Por otro lado, el IFN- $\gamma$  sérico sólo se halló alto en la cepa BALB/c (Fig. 3). En la cepa C3H, en cuyo suero no detectamos niveles importantes de IFN- $\gamma$  a pesar de la

presencia de IL-12, tampoco observamos un incremento de la producción de IFN- $\gamma$  en las células del bazo con respecto a los controles, aun cuando éstas fueron estimuladas *in vitro* con Concanavalina A en presencia de IL-2<sup>47</sup>. La casi ausencia de IFN- $\gamma$  en los C3H a pesar de los altos niveles de IL-12 indicaría claramente la necesidad de otros factores para inducir la producción de IFN- $\gamma$ . La inversa también parece cierta, ya que el IFN- $\gamma$  puede producirse independientemente de IL-12<sup>60</sup>. De modo que, si bien en los BALB/c hay tanto IL-12 como IFN- $\gamma$ , no puede afirmarse que haya una relación directa entre ellas.

Estas dos cepas de ratones tienen diferente susceptibilidad al desarrollo del daño tisular en la fase crónica. Esta etapa es relativamente benigna en la cepa BALB/c, pero la C3H desarrolla una importante miocardiopatía progresiva<sup>45</sup>. Los resultados, indirectamente sugieren la falta de una relación directa entre los niveles de IFN- $\gamma$  y el daño tisular en la fase crónica.

### Consideraciones finales

Las concentraciones de citoquinas detectadas en diferentes niveles, como ser presencia de células productoras, expresión del ARNm, producción *in vitro* por células purificadas, espontánea o estimulada, y sus concentraciones séricas, estarían relacionadas con la capacidad de ejercer su actividad biológica. La respuesta inmune innata inicial a nivel de los órganos linfáticos periféricos, como el bazo y nódulos linfáticos, específicamente preparados para comenzar la respuesta adaptativa del sistema inmune, estaría relacionada con el control de la infección en la fase aguda. Por otro lado, como para ejercer su función las citoquinas parecen necesitar una alta concentración local que se logra con su liberación localizada<sup>31</sup>, es posible que el daño tisular tenga mayor relación con aquellas citoquinas producidas por las células presentes en los infiltrados tisulares, cuyo perfil de producción puede diferir del observado en los órganos linfáticos periféricos<sup>61</sup>. De todos modos no puede descartarse que el efecto sistémico de los altos niveles séricos de citoquinas proinflamatorias pueda afectar directamente tanto a la respuesta en los órganos linfáticos como a los tejidos sensibles al daño, o bien potenciar el efecto de las citoquinas producidas en los infiltrados locales.

El papel de la respuesta inmune en la resistencia, dependería de la calidad y del balance a que llega la respuesta TH1, y podría ser evaluada en la etapa silenciosa, asintomática, que sigue inmediatamente a la infección. Mientras que en la fase florida, de incremento de parasitemia, donde los niveles de citoquinas TH1 son tan altos que pueden detectarse en suero, el exceso de producción o bien su falta de control, podría estar relacionado con el daño tisular.

La infección con *T. cruzi* parece inducir una respuesta predominantemente TH1 con diferentes características según las bases genéticas de ambos, el huésped y el parásito. Si bien el eje IL-12/NK/IFN- $\gamma$  parece ser el principal protagonista, nuestros resultados sugieren que ésta es la parte visible del iceberg de la respuesta TH1, y que sus moduladores, no todos conocidos, tienen un papel muy importante para determinar la expresión de una amplia gama de respuestas protectoras TH1 y de modularlas para controlar el daño tisular.

## Bibliografía

- Schmuñis GA. La Tripanosomiasis Americana como problema de salud pública. En: La enfermedad de Chagas y el sistema nervioso. Organización Panamericana de la Salud. Washington 1994; 3-31.
- Wisnivesky-Colli C, Ruiz AM, Gurtler RE, et al. Dynamics of transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Argentina. IV Serologic, parasitologic and electrocardiographic study of the human population. *Medicina (Buenos Aires)* 1989; 49: 341-50.
- Tarleton RL, Kuhn RE. Changes in cell populations and immunoglobulin-producing cells of the spleen in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Correlation with parasite-specific antibody response. *Cell Immunol* 1983; 80: 392-404.
- Rottenberg ME, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL, Örn A. Role of helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol* 1988; 28: 573-82.
- Nogueira N, Ellis J, Chaplan S, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: *in vivo* and *in vitro* correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp Parasitol* 1981; 51: 325-32.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$  treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . *Eur J Immunol* 1992; 22: 2501-6.
- Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Inf Immun* 1994; 62: 5177-82.
- Silva JS, Vespa GNR, Cardoso MAG, Aliberti JCS, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Inf Immun* 1995; 63: 4862-7.
- Olivares-Fontt E, Vray B. Relationship between granulocyte macrophage-colony stimulating factor, tumour necrosis factor- $\alpha$  and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. *Par Immunol* 1995; 17: 135-41.
- Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Inf Immun* 1998; 66: 1208-15.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-46.
- Trinchieri G, Scott P. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol Today* 1994; 15: 460-3.
- Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Inf Immun* 1996; 64: 1961-7.
- Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, et al. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 1997; 99: 937-43.
- Meyer Zum Buschenfelde C, Cramer S, Trumpfheller C, Fleischer B, Frosch S. *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression *in vivo*: correlation with interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) production. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 378-85.
- Nabors GS, Tarleton RL. Differential control of IFN- $\gamma$  and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1991; 146: 3591-8.
- Borges MM, Vassao RC, Pereira CA, Kloetzel JK.  $\gamma$ -IFN and macrophage respiratory burst in *Calomys callosus* challenged with *Trypanosoma cruzi* bloodstream and metacyclic forms. *Immunol Lett* 1994; 42: 81-5.
- Clinton BA, Ortiz-Ortiz L, García W, Martínez T, Capin R. *Trypanosoma cruzi*: Early immune response in infected mice. *Exp Parasitol* 1975; 139: 417-25.
- Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCR I T cells. *Immunol Rev* 1989; 112: 183-207.
- Hunter CA, Slifer T, Araujo F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Inf Immun* 1996; 64: 2381-6.
- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Inf Immun* 1996; 64: 128-34.
- Tarleton RL. Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 1990; 144: 717-24.
- Rottenberg ME, Lindqvist C, Koman A, Segura EL, Örn A. Modulation of both interleukin-2 receptor expression and interleukin-2 production during experimental murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol* 1989; 30: 65-72.
- Russo M, Starobinas N, Do Santos RR, Minoprio P, Eisen H, Joskowicz MH. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *Par Immunol* 1989; 11: 385-95.
- Tarleton RL. Pathology of American trypanosomiasis. En: Warren KS, ed. Immunology and molecular biology of parasitic infections. London: Blackwell Sc Pub, 1993: 64-71.
- Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. Depletion of T cell populations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Inf Immun* 1994; 62: 1820-9.
- Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Padua MA. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 111-5.
- Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. I. Evidence for the presence of IL-2 producing cells. *J Immunol* 1988; 140: 2763-8.
- Truyens C, Angelo-Barrios A, Torrico F, Damme JV,

- Heremans H, Carlier Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: Effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Inf Immun* 1994; 62: 692-6.
30. Tarleton RL. Tumor necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* 1988; 73: 186-90.
  31. Janeway Jr CA, Travers P. En: Immunobiology. The immune system in health and disease. 2° edición. Stamford Press, Singapore. 1996.
  32. Scharfstein J, Barcinski MA, Leon LL. Induction of the acute-phase protein serum amyloid P in experimental Chagas' disease. *Inf Immun* 1982; 35: 46-51.
  33. Santos Lima EC, García I, Vicentelli MH, Vassalli P, Minoprio P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Inf Immun* 1997; 65: 457-65.
  34. Martín UO, Afchain D, Cesbron JY, Arias E, Capron A. Inmunoglobulina E y enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)* 1986; 46: 262-6.
  35. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon  $\gamma$  regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1992; 175: 169-74.
  36. Hunter CA, Ellis NL, Slifer T, et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 1997; 158: 3311-6.
  37. Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. Production of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, and IL-10 by CD4<sup>+</sup> lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88: 7011-5.
  38. Scharton Kersten T, Scott P. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 515-22.
  39. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1994; 153: 3135-40.
  40. Eksi S, Wassom DL, Powell MR. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: profiles and compartmentalization of IL-2-, -4-, -5-, -10-, and IFN- $\gamma$ -producing cells. *J Parasitol* 1996; 82: 59-65.
  41. Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by *in situ* immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 1996; 26: 102-9.
  42. Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). *J Exp Med* 1991; 174: 539-45.
  43. Hunter CA, Chizzonite R, Remington JS. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J Immunol* 1995; 155: 4347-54.
  44. Scott MT, Moyes L. <sup>75</sup>Se-methionine labelled *Trypanosoma cruzi* blood trypomastigotes: opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. *Clin Exp Immunol* 1982; 48: 754-7.
  45. Morales MC, Cardoni RL, Rimoldi MT, Esteva M, Mllei J. Heart damage comparing three strains of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 1987; 47: 493-9.
  46. D'Imperio-Lima MR, Joskowicz MH, Coutinho A, Kipnis T, Eisen H. Very large and isotypical polyclonal plaque forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol* 1985; 15: 201-3.
  47. Antúnez MI, Cardoni RL. Kinetics of IL-12 and IFN- $\gamma$  production, and NK cell activity, in two strains of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. 1999 (enviado para su publicación).
  48. Trishmann TM. *Trypanosoma cruzi*: Early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. *Exp Parasitol* 1986; 62: 194-201.
  49. Itoh K, Suzuki R, Umezū Y, Hanaumi K, Kumagai K. Studies of murine large granular lymphocytes. II. Tissue, strain, and age distributions of LGL and LAL. *J Immunol* 1982; 129: 395-400.
  50. McCabe RE, Meagher SG, Mullins BT. Endogenous Interferon  $\gamma$ , macrophage activation, and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Inf Dis* 1991; 163: 912-15.
  51. Plata F, Garcia Pons F, Wiertzerbin J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*. Synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma *in vivo*. *Ann Inst Pasteur* 1987; 138: 397-415.
  52. Mattner F, Fischer S, Guckes S, et al. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2202-8.
  53. Jung T, Wijdenes J, Neumann C, de Vries J, Yssel H. Interleukin-13 is produced by activated human CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> T cells: modulation by interleukin-4 and interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996; 26: 571-7.
  54. Revelli S, Gomez L, Wiertzerbin J, Bottasso O, Basombrio MA. Levels of tumor necrosis factor alpha, and interleukins 4, 6 and 10 as determined in mice with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1999; 85: 147-50.
  55. Hoft DF, Lynch RG, Kirchhoff LV. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 1993; 151: 7038-47.
  56. Heinzel FP, Rerko RM, Ling P, Hakimi J, Schoenhaut DS. Interleukin 12 is produced *in vivo* during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. *Inf Immun* 1994; 26: 4244-9.
  57. Cardoni RL, Antúnez MI, Morales C, Nantes IR. Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 329-34.
  58. Petray P, Castaños VE, Grinstein S, Örn A, Rottenberg ME. Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett* 1995; 47: 121-6.
  59. Jacobs F, Dubois C, Carlier Y, Goldman M. Administration of anti-CD3 monoclonal antibody during experimental Chagas' disease induces CD8<sup>+</sup> cell-dependent lethal shock. *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 233-8.
  60. Scharton Kersten T, Caspar P, Sher A, Denkers EY. *Toxoplasma gondii*: evidence for interleukin-12-dependent and-independent pathways of interferon-gamma production induced by an attenuated parasite strain. *Exp Parasitol* 1996; 84: 102-14.
  61. Zhang L, Tarleton RL. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol* 1996; 84: 203-13.