
La infección por *Trypanosoma cruzi* en ratones gestantes induce una respuesta inmune celular con producción de citocinas en sus fetos.

Maritza Alarcón¹, Loredana Goncalves², Cesare Colasante³, Sonia Araujo¹, Elio Moreno¹, Mary Carmen Pérez-Aguilar¹.

¹Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX).

²Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR), Facultad de Ciencias.

³Laboratorio de Fisiología de la Conducta, Facultad de Medicina. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, respuesta inmune celular, citocinas, fetos.

Resumen. El objetivo del presente estudio fue detectar las citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 expresadas por células T CD4+ en tejidos de fetos de ratones con infección chagásica aguda. Para ello, se examinaron fetos de ratones NMRI cuyas madres fueron infectadas con 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos de la cepa M/HOM/BRA/53/Y de *T. cruzi* y preñadas durante la fase aguda de la infección. Para la detección y localización de infiltrados inflamatorios, nidos de parásitos, antígenos de *T. cruzi* y citocinas se emplearon las técnicas de hematoxilina-eosina, peroxidasa-anti-peroxidasa e inmunofluorescencia indirecta. Se detectaron infiltrados inflamatorios y antígenos con nidos de amastigotes en el músculo esquelético fetal. Células T CD4+ productoras de IFN- γ así como depósitos de IFN- γ e IL-10 fueron detectados en las secciones de placenta, corazón y músculo esquelético de fetos de ratones infectadas, mientras que células CD4+/IL-10+ se encontraron sólo en músculo esquelético, adicionalmente se detectaron depósitos de IL-4 sólo en placentas de ratones sanas. Estos resultados indican que el feto es capaz de generar una respuesta inmune propia frente a antígenos transmitidos por su madre, lo cual induce la secreción de citocinas que actuando en sinergia con los anticuerpos maternos le confieren un estado de protección contra la infección, y que la transmisión del parásito depende de factores específicos de cada madre, la cual puede modificar su capacidad de controlar tal transmisión ya sea a nivel placentario o sistémico.

***Trypanosoma cruzi* infection in pregnant mice induces a cellular immune response with cytokines production in their fetuses.**

Invest Clin 2011; 52(2): 150 - 161

Key words: *Trypanosoma cruzi*, cellular immune response, cytokines, fetuses.

Abstract. The objective of this study was to detect the cytokines IFN- γ , IL-4 and IL-10 expressed by CD4+ T cells in tissues of fetal mice with acute chagasic infection. For this, we examined the fetuses of NMRI mice whose mothers were infected with 22×10^3 metacyclic trypomastigotes of the M/HOM/BRA/53/Y strain of *T. cruzi* and made pregnant during the acute phase of infection. For the detection and localization of inflammatory infiltrates, nest parasites, antigens of *T. cruzi* and cytokines we used hematoxylin-eosin techniques, peroxidase-anti-peroxidase and immunofluorescence. The immunohistochemical study revealed the presence of inflammatory infiltrates and antigens with amastigote nests in fetal skeletal muscle. CD4 + T cells producing IFN- γ , as well as deposits of IFN- γ and IL-10, were detected in sections of placenta, heart and skeletal muscle of fetuses of mice infected, while CD4+/IL-10+ was found only in skeletal muscle; in addition, deposits of IL-4 were detected only in placentas of healthy mice. These results indicate that fetuses are capable of generating their own immune response to antigens transmitted by their mother, which induces the secretion of cytokines and that, acting in synergy with the maternal antibodies, confer them a state of protection against infection; and that the transmission of the parasite depends on factors specific to each mother, which may modify its ability to control such transmission at the placental or systemic levels.

Recibido: 11-11-2010 Aceptado: 10-03-2011.

INTRODUCCIÓN

Las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que actualmente a nivel mundial existen 10 millones de personas infectadas con *Trypanosoma cruzi* y más de 25 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección, principalmente en América Latina donde la enfermedad es endémica (1).

Aunque la transmisión vectorial de *T. cruzi* es la que genera la mayor cantidad de casos de la enfermedad, la transmisión vertical desde la madre infectada a su hijo ocurre entre un 2% y un 8% (2). Existe consen-

so acerca de que aun cuando se interrumpiera totalmente la transmisión vectorial, la infección congénita continuaría siendo un problema de salud pública hasta que las mujeres infectadas en período de gestación disminuyan proporcionalmente, por lo que seguirán apareciendo casos de Chagas congénito por más de treinta años (3).

En la Enfermedad de Chagas, la interacción parásito-hospedador es dinámica y la probabilidad de transmisión congénita puede depender de muchos factores que varían entre los diferentes países y las distintas áreas geográficas, presentándose diferencias en cuanto a: la genética de la cepa, la preva-

lencia de la infección por *T. cruzi* en mujeres en edad fértil, la tasa de transmisión, la morbilidad y la mortalidad (4-6). Las posibles diferencias en la sensibilidad de las pruebas diagnósticas utilizadas, la virulencia del parásito y algunos factores inmunes distintivos de las madres también pueden contribuir con tales variaciones geográficas (7).

Estudios realizados tanto en humanos como en animales experimentales han postulado que durante el embarazo la madre desarrolla una respuesta inmune supresora, por lo que la transferencia materno-fetal de antígenos del parásito podría influir en la capacidad de la progenie de responder a la infección al modular positivamente su sistema inmune (8, 9). El feto es generalmente considerado como inmaduro a nivel inmune desde el punto de vista del reconocimiento de antígenos extraños, puesto que la placenta le otorga un ambiente inmunoprivilegiado; no obstante se ha demostrado que los fetos infectados son perfectamente capaces de desarrollar una respuesta inmune celular linfocitaria específica contra el parásito ya que ellos poseen el repertorio de linfocitos capaces de ser activados al reconocer antígenos extraños aun cuando se ubiquen a nivel periférico (7, 10).

En recién nacidos congénitamente infectados por *T. cruzi* se han observado niveles significativamente bajos de neutrófilos y de monocitos pero no de linfocitos, esto puede estar relacionado con la expansión clonal de células T CD8+ y con la alta producción de IFN- γ en sangre de cordón umbilical (7). De igual forma, se ha determinado que los neonatos no infectados, nacidos de madres infectadas por *T. cruzi* desarrollan *in útero*, una ligera activación linfocitaria sin polarización hacia el tipo Th1 o Th2, con una clara respuesta de células B evidenciada por la producción de anticuerpos IgM e IgA específicos para *T. cruzi* y una activación de monocitos los cuales producen citocinas pro-inflamatorias (11).

Algunos autores señalan que dependiendo del estímulo antigénico, la producción de citocinas puede ocurrir independientemente en la madre, en el feto y/o en la placenta (11, 12). Otros autores han encontrado que en la placenta se pueden producir diversas citocinas a excepción del IFN- γ , lo que sugiere que el sistema inmune fetal puede producir este péptido en respuesta a un determinado estímulo. Esto pudiese indicar que un potente estado de activación celular es inducido en hijos no infectados (y probablemente en fetos) de madres infectadas, estimulando la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en presencia de antígenos del parásito (13).

Tal influencia materna en la inmunidad innata y adquirida del neonato puede tener un efecto protector, limitando de esta forma la susceptibilidad a la infección congénita (14); sin embargo, aún se desconocen los factores que favorecen la transmisión vertical del parásito, así como los que protegen a la mayoría de los hijos de madres infectadas, por lo que es importante determinar factores adicionales que contribuyen con la resistencia a la infección.

El objetivo de este estudio fue detectar las citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 expresadas en células T CD4+ en tejidos de fetos de ratones *NMRI* infectadas con *T. cruzi* y preñadas durante la fase aguda de la infección, de esta manera podríamos comprender un poco más acerca de los posibles mecanismos que operan ante la transmisión congénita por *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de *Trypanosoma cruzi*

Se utilizaron tripomastigotes metacíclicos de la cepa de referencia internacional: M/HOM/BRA/53/Y de *T. cruzi* aislada de un caso agudo humano de enfermedad de Chagas, en Brasil (15). Los parásitos se

han mantenido mediante pases intermedios en ninfas de *Rhodnius prolixus* criadas en el laboratorio y comprobadamente sanas.

Infección experimental de las ninfas de *R. prolixus*

Las ninfas de quinto estadio de *R. prolixus* se alimentaron hasta la repleción sobre ratones con altas parasitemias y se mantuvieron en el insectario experimental bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa.

Preparación del inóculo de *T. cruzi*

A los 30 días de la primera ingesta sanguínea las ninfas de *R. prolixus* fueron alimentadas sobre ratones sanos y las deyecciones fueron revisadas para la detección y cuantificación de parásitos (16), el número de parásitos se ajustó hasta obtener 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos en 0,05 mL de solución salina estéril al 0,85%.

Infección experimental y apareamiento

La manipulación de los animales se llevó a cabo siguiendo el protocolo para el manejo de animales de experimentación del FONACIT en su capítulo 2. Para esto se utilizaron 24 ratones hembras NMRI (*Mus musculus*) de un mes de nacidas y con un peso promedio de 20 g, las cuales fueron separadas en 4 grupos de 6 ratones cada uno, clasificados como: infectadas y preñadas en fase aguda de la infección, vírgenes infectadas (control infectado), sanas vírgenes (control sano) y sanas preñadas (control gestante). Dos grupos de ratones fueron inoculadas con 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* por vía intraperitoneal (ip) y la parasitemia fue estimada a partir de los 10 días post-infección (pi) extrayendo 5 μ L de sangre de la cola de cada ratón (16). A los 15 días post-infección los animales del grupo infectadas preñadas y las preñadas se colocaron en jaulas individuales en una relación 2 hembras: 1 macho durante 3

días y luego fueron separadas y mantenidas con Ratarina® y agua *ad libitum*.

Extracción de los fetos

Un total de 56 fetos con 20 días de desarrollo fueron extraídos de los ratones a través de una incisión longitudinal de la membrana uterina, se lavaron con solución fisiológica y las muestras de placenta, corazón y músculo esquelético fetal fueron fijadas en formalina neutra al 10% por 24 h, deshidratados en alcohol isopropílico (Científica Andina, Mérida, Venezuela), alcohol-acetona 1:1, acetona-xilol 1:1 (Sigma, St. Louis, USA), xilol durante 30 min cada pase (J.K. Baker, Canadá), y xilol-parafina 1:1 a 56°C durante 24 h, para ser finalmente impregnados con parafina pura a 56°C por 24 h (Monoject Scientific, St. Louis, MO. USA) y cortados en secciones de 7 μ m de espesor mediante el uso de un micrótopo (American Optical, Model 820, Spencer, USA).

Pre-tratamiento de las secciones histológicas

Los cortes seriados de placenta y tejidos fetales (corazón y músculo esquelético) fueron colocados en láminas portaobjetos (Cristalería Madrileña CM, Venezuela) cubiertas con poly L-lysina al 0,01% (Sigma, St. Louis, USA), y se sumergieron en xilol durante 2 horas para eliminar residuos de parafina. Luego fueron rehidratadas mediante pases sucesivos por una serie decreciente de alcohol isopropílico de 100%, 90%, 80% y 70% por espacio de 20 minutos cada pase, posteriormente fueron pasadas 2 veces por agua destilada durante 20 minutos. Finalmente se incubaron con una solución de glicina (Promega, USA) a 100 mM en PBS a pH 7,2 por 20 minutos con la finalidad de eliminar el exceso de aldehído presente en las muestras, producto del tratamiento de fijación y se lavaron 2 veces con PBS-Tween 20 (Sigma, St. Louis, USA) al 0,05% por 10 minutos.

Detección de antígenos de *T. cruzi*

Los cortes de tejido fueron incubados con suero normal de cabra al 30% para bloquear los sitios de unión inespecíficos. La detección de antígenos de *T. cruzi* fue realizada mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando como anticuerpo primario suero anti-*T. cruzi* producido en conejo diluido 1:300 en PBS, y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo producido en cabra, conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, USA) diluido 1:500 en PBS. Se adicionó yoduro de propidio (Molecular Probe, Inc, USA) a una dilución 1:2000 en PBS con la finalidad de teñir ADN, luego las muestras fueron cubiertas con glicerina tamponada (9:1) y observadas en un microscopio confocal (CD System, Olympus Optical CO, Japan). En otras secciones de tejidos se evaluó la detección de antígenos de *T. cruzi* mediante la ejecución de la técnica de inmuno-peroxidasa indirecta. Para ello, dichas secciones de tejidos fetales fueron desparafinadas, rehidratadas y se incubaron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Merck, Alemania) al 3% en metanol (Sigma, St. Louis, USA) por 30 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Luego fueron lavadas 2 veces con PBS a pH 7,2 durante 10 minutos cada lavado e incubadas con suero normal de cabra al 30% en PBS 30 minutos. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS (10 minutos c/u), se incubaron por una hora en cámara húmeda con suero anti-*T. cruzi* producido en conejo diluido 1:300 en PBS a pH 7,2 y se lavaron 2 veces con PBS para ser incubadas con anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado a peroxidasa (HRP) (Sigma, St. Louis, USA) diluido 1:500 en PBS durante 45 minutos. Las secciones de tejido se lavaron 2 veces con PBS durante 10 minutos cada lavado y se incubaron en cámara húmeda con solución reveladora (una pastilla de 3,3- dia-

minobenzidina (DAB) y una de urea en 5 mL de agua desionizada) (Sigma, St. Louis, USA) durante 45 minutos. Seguidamente, fueron lavadas con PBS y contracoloradas con Hematoxilina de Mayer (Sigma, St. Louis, USA) durante una hora y finalmente se cubrieron con glicerina tamponada (Didacta C.A., Caracas, Venezuela) para ser observadas al microscopio óptico (Leica DMLS, Shanghai, China) con objetivo de 40X.

Estudio histopatológico en los tejidos fetales

Los cortes de 7 μ m de placenta, corazón y músculo esquelético fetales se colorearon pasándolos durante 30 minutos por Hematoxilina de Mayer, un pase por agua y 5 minutos por Eosina (Merck, Alemania). Posteriormente los cortes de tejido se pasaron de forma sucesiva por alcohol isopropílico al 70%, 80%, 90% y 100% por espacio de 10 minutos cada uno y tres pases por xilol de 15 minutos cada uno. Finalmente, se cubrieron con Mar-Tex (Macrosearch C.A, Suecia) y se observaron al microscopio óptico.

Detección de citocinas

Las secciones de tejidos (placenta, corazón y músculo esquelético), se incubaron con saponina (Sigma, St. Louis, EE.UU) al 0,05% por 20 minutos y con suero normal de conejo al 30% por 30 minutos, seguidamente fueron lavadas 2 veces por 10 minutos con PBS-Tween 20. El esquema de trabajo fue diseñado a fin de determinar la presencia de citocinas de manera individual en células CD4+, de tal forma que se clasificaron los cortes de tejidos por grupos de estudio con las siguientes combinaciones de anticuerpos: 1) anti-IFN- γ , anti-IgG-PE, anti-CD4-FITC; 2) anti-IL4, anti-IgG-PE, anti-CD4-FITC; 3) anti-IL-10, anti-IgG-PE, anti-CD4-FITC.

La detección de citocinas se realizó mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, utilizando como anticuerpos

primarios: anti-IFN- γ , anti-IL4 y anti-IL-10 (IgG de cabra). (Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, USA) diluidos 1:300 en una solución de PBS-BSA al 2% durante 1 hora y lavadas con PBS-Tween 20. La interacción fue evidenciada adicionando a los tejidos como anticuerpo secundario anti-IgG de cabra producido en conejo conjugado a PE (Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, USA), diluido 1:300 e incubado por 30 minutos. Adicionalmente, las láminas fueron lavadas 2 veces con PBS-Tween 20 por 10 minutos y la detección de CD4 se evidenció mediante Inmunofluorescencia directa con el anticuerpo monoclonal anti-CD4 conjugado a FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, USA), diluido 1:300 durante 30 minutos, finalmente la láminas fueron cubiertas con glicerina tamponada (9:1) y observadas en el microscopio confocal.

Análisis estadístico

Los resultados son presentados en promedios \pm el error estándar (EE), se realizó un ANOVA de una vía y el postest de Dunnet para establecer si existían diferencias significativas entre los grupos, considerando como estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$. Los análisis fueron realizados utilizando el software GraphPad (GraphPad Prism versión 5.0, San Diego, C.A).

RESULTADOS

En las secciones de placenta, corazón y músculo esquelético del 38% (21/56) de los fetos de ratones NMRI infectadas con la cepa Y de *T. cruzi* y preñadas durante la fase aguda de la infección se detectaron antígenos de *T. cruzi* focalizados entre y sobre las fibras musculares (Figs. 1A y 1B) así como a nivel del estroma, con la presencia de un nido de amastigotes en el tejido muscular esquelético de un sólo feto e infiltrado de células mononucleares en músculo cardíaco (Figs. 2A y 2B).

A nivel de músculo esquelético del 17% (10/56) de los fetos de ratones infectadas preñadas se evidenció la presencia de células CD4+/IFN- γ +, depósitos de IFN- γ , depósitos de IL-10, así como células CD4+/IL-10+ y CD4-/IL-10+ (Figs. 3A y 3B), mientras que en el 9% (5/56) de los corazones se detectaron células CD4+/IFN- γ + y células CD4-/IL-10+. Adicionalmente, en el 41% (23/56) de las placentas del grupo de ratones infectadas y preñadas durante la fase aguda de la infección se observaron células CD4+, células CD4+/IFN- γ + y depósitos de IL-10 (Fig. 3C, Tabla I).

Debemos destacar que en el 27% (15/56) de las placentas de ratones NMRI sanas preñadas se observaron células CD4+, células CD4-/IFN- γ + y depósitos de IL-4. A nivel del corazón y músculo esquelético de los fetos de los ratones NMRI sanas se detectaron tanto células CD4+ como células CD4-/IL-10+ (Tabla I).

DISCUSIÓN

Este estudio permite confirmar que los fetos de ratones NMRI infectadas con *T. cruzi* desarrollan una respuesta inmune celular propia frente a los antígenos parasitarios y se reporta por primera vez la detección de citocinas y células T CD4+ en tejidos fetales.

La resistencia del hospedador a la infección por *T. cruzi* depende de la respuesta inmune innata y adaptativa (17). Durante la primera semana de la infección en ratones, *T. cruzi* induce una respuesta inmune celular cuya activación se produce a través de la inducción de IL-12 (1) e IFN- γ (18), las cuales son citocinas que participan en la activación de los macrófagos en la respuesta inmune innata. La respuesta inmune adaptativa mediada principalmente por células T CD4+ es el medio más eficaz en el control de la replicación del parásito puesto que dichas células promueven la activación de

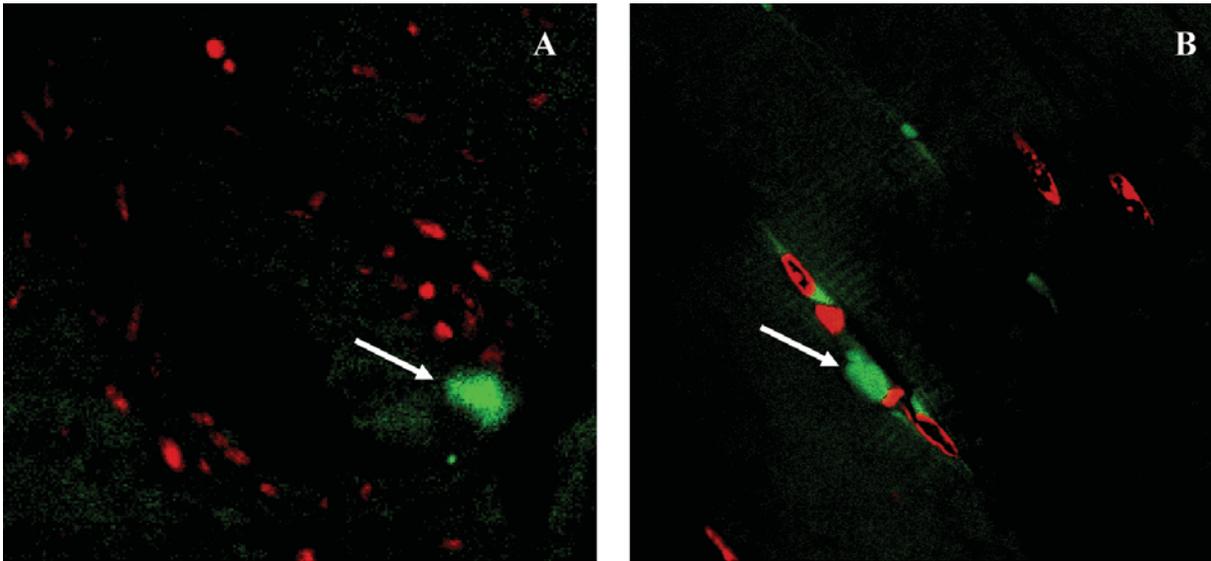


Fig. 1. Inmunofluorescencia Indirecta en tejidos de fetos de ratones infectadas con la cepa Y de *T. cruzi* y preñadas en fase aguda de la infección. A) Antígeno focalizado en el corazón (600X), B) Antígeno entre las fibras del músculo esquelético (600X).

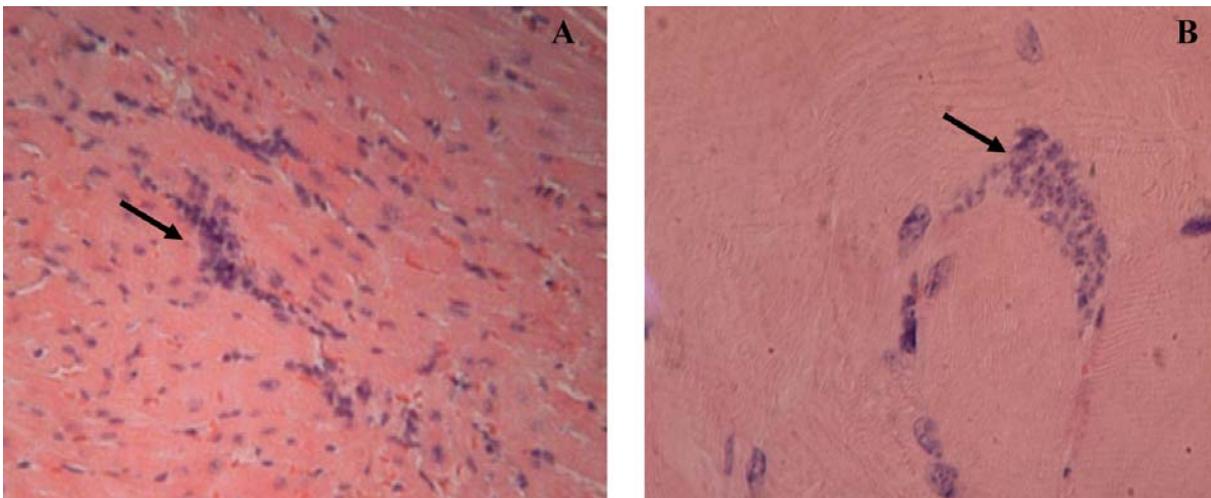


Fig. 2. Secciones de corazón y músculo esquelético de fetos de ratones infectadas con la cepa Y de *T. cruzi* y preñadas en fase aguda de la infección. A) Infiltrado inflamatorio focalizado entre las fibras del músculo cardíaco (H-E, 40X). B) Nido de amastigotes en músculo esquelético (H-E, 100X).

macrófagos y la proliferación de células T CD8+ y células B (18,19). Las células T CD8+ están involucradas en la producción de IFN- γ y tienen una actividad citolítica específica hacia las células infectadas y el control de la replicación intracelular del parási-

to, mientras que las células B producen inmunoglobulinas que participan en la opsonización y la fagocitosis, así como la lisis mediada por el sistema de complemento (17).

Durante el embarazo se produce una supresión transitoria de la inmunidad me-

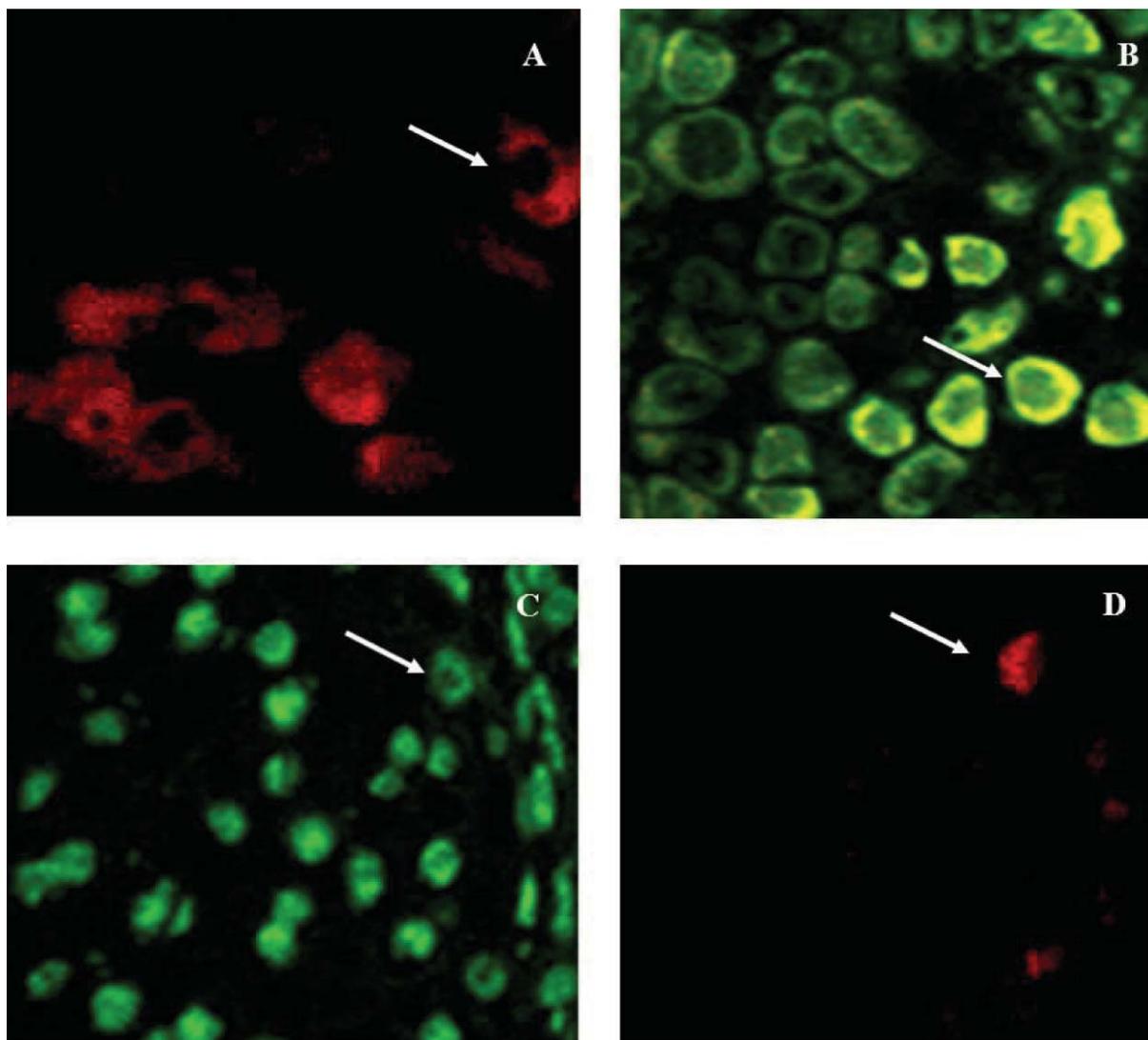


Fig. 3. Células productoras de IFN- γ e IL-10 en tejidos de fetos de ratones infectadas con la cepa Y *T. cruzi* y preñadas en fase aguda de la infección. A) células CD4- productoras de IFN- γ en el músculo esquelético (1800X). B) colocalización de células CD4+/IL-10+ en músculo esquelético (1800X). C) células CD4+ en placenta (600X). D) Depósitos de IFN- γ en corazón (600X).

diada por células, con disminución de las funciones de las células CD8+ y bajos niveles de células CD4+ y NK, con la finalidad de prevenir el rechazo de la madre hacia el feto (20-22). Este medio ambiente inmune, denominado inmunosupresión fisiológica puede llevar a que tanto en la madre como en el feto se produzca un incremento en la susceptibilidad a infecciones por organismos patógenos (14).

Al ser la placenta considerada como un órgano inmunoprivilegiado, la inflamación placentaria representa una respuesta inmune primaria del feto a la infección, ya que es la primera barrera que encuentra el parásito en la circulación materno-fetal (23, 24). La presencia de antígenos de *T. cruzi* en placenta y músculo esquelético de los fetos de madres infectadas, así como la presencia de un nido de amastigotes a nivel del

TABLA I
 MARCADOR FENOTÍPICO DE CÉLULAS T Y CITOCINAS DETECTADAS EN FETOS DE RATONES
 INFECTADAS PREÑADAS Y DE RATONES SANAS PREÑADAS

	Corazón		Músculo Esquelético		Placenta	
	FRIP	FRSP	FRIP	FRSP	FRIP	FRSP
CD4+	0	3,22±0,68	0	5,89±0,57	13,3±1,56*	3,15±0,58
IFN- γ	5,77±0,98	0	4,67±0,61	0	0	0
IL-10	0	0	8,65±3,32	0	4,61±0,55	5,44±0,82
IL-4	0	0	0	0	0	2,11±0,36
CD4-/IFN- γ +	12,67±2,18	0	14,28±1,93	0	0	1,20±0,30
CD4+/IFN- γ +	3,61±0,60	0	2,11±0,40	0	2,55±0,41	0
CD4-/IL-10+	2,33±0,35	2,77±0,55	3,57±0,68	4,61±0,81	0	0
CD4+/IL-10+	0	0	8,01±2,02	0	0	0

Los resultados son expresados en promedios \pm el error estándar (correspondientes a número de células por campo), *p!,05 con respecto al grupo FRSP. Fetos de ratones infectadas preñadas (FRIP), fetos de ratones sanas preñadas (FRSP).

músculo esquelético fetal es un indicativo de que hubo transmisión materno-fetal del parásito.

Los recién nacidos y los niños son muy susceptibles a las infecciones, esto es generalmente asociado a la inmadurez de su sistema inmune, el cual se define por una baja capacidad para generar una respuesta inmune mediada por células (25). No obstante, la activación de células T CD8+ en los recién nacidos con infección congénita por *T. cruzi* (10), o citomegalovirus indican que esta inmadurez no es del todo absoluta (26).

La transmisión del parásito depende de factores individuales específicos de cada madre, la cual puede modificar su capacidad de controlar tal transmisión, ya sea a nivel placentario o sistémico (7); sin embargo, también influyen los factores placentarios que impiden la transmisión del parásito y la capacidad de los fetos para desarrollar una respuesta inmune.

En ausencia de transmisión congénita, una madre infectada por *T. cruzi*, puede modular el sistema inmune de su feto, induciendo una respuesta inmune tanto innata

como adquirida (11); a través de la activación de diversos tipos celulares del sistema inmune, evidenciado por la producción de anticuerpos específicos por parte de las células B y la secreción de citocinas por las células efectoras T CD4+, T CD8+, monocitos/macrófagos, mastocitos, células dendríticas y NK, entre otras (27,28), siendo las citocinas las proteínas responsables del control de la replicación del parásito y del balance de la respuesta inmune en animales infectados (29). La presencia de células T CD4 e IFN- γ en músculo esquelético fetal y en placenta, aporta evidencia de que las células CD4+ propias del feto, constituyen otra fuente de producción de esta citocina, las cuales pudieran activarse luego del encuentro con el antígeno, ya que no existen evidencias de transferencia de células CD4+ de la madre al feto.

Aunque las células CD4+ y CD8+ son fuentes importantes de producción de IFN- γ , experimentos *in vitro* sugieren que las células NK son la principal fuente de producción de esta citocina durante cualquier fase de la infección por *T. cruzi* (30), es por ello que no descartamos la posibili-

dad de que en los tejidos fetales donde no se detecto el marcador fenotípico CD4, sean las propias células NK la fuente de producción de dicha citocina.

Algunos investigadores han reportado que las células CD8+ son la subpoblación de linfocitos T predominantes en la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, mientras que otros sugieren que la subpoblación dominante son las células CD4+ (30). No obstante, (23), a través de estudios inmunohistoquímicos de caracterización de infiltrados inflamatorios realizados en placentas de mujeres chagásicas se ha descrito un predominio de células CD8+ sobre otros tipos celulares como son las células CD4+, macrófagos CD68+/CD15+ y células NK. La escasa cantidad de linfocitos CD4+ detectados por estos investigadores en el tejido placentario probablemente no refleje su verdadera importancia en el proceso infeccioso, ya que los linfocitos CD4+ del fenotipo Th1, son los principales responsables de la inducción de la respuesta inmune protectora desarrollada tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección por *T. cruzi* (31), así como ocurre en otros modelos de infecciones por parásitos intracelulares como *Leishmania major* y *Toxoplasma gondii*.

A pesar que los efectos de la IL-10 en monocitos/macrófagos y su capacidad para inhibir la respuesta de tipo Th1 están bien establecidos, cada vez hay más pruebas que indican que la IL-10 no puede ser considerada simplemente como una citocina anti-inflamatoria e inmunosupresora (31), ya que existen evidencias que señalan que esta citocina mejora la actividad citolítica de las células CD8+ y de las células NK favoreciendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (32); además que durante el embarazo, hay niveles fisiológicos de IL-10 (10). En este sentido, aunque la producción de IFN- γ es necesaria para la resistencia a la infección por *T. cruzi* en ratones, la secreción de IL-10 también

podría ser fundamental en la determinación de los parámetros que confieren resistencia o susceptibilidad a la infección dependiendo del modelo experimental empleado (33).

La ausencia de IL-4 en los tejidos fetales indica que existe una clara polarización de la respuesta hacia el patrón Th1, la cual es indispensable para la eliminación del parásito, a diferencia de lo observado en los ratones gestantes sanos donde si se observó depósitos de IL-4 e IL-10 placentario, indicando que en el embarazo fisiológicamente normal se evidencia una respuesta inclinada hacia el patrón Th2 a fin de evitar el rechazo del feto, favoreciendo de este modo la implantación del embrión.

La detección de células CD4+ en ausencia de coexpresión de IFN- γ , IL-10 o IL-4 en los tejidos de fetos de ratones sanos es un hecho lógico; ya que la activación de los linfocitos y por ende la secreción de citocinas de un determinado patrón ocurre luego del encuentro con el antígeno, lo que corrobora la hipótesis de que la respuesta inmune propia del feto se activa a fin de eliminar el parásito.

El hecho de que nazcan recién nacidos sanos provenientes de madres infectadas, sugiere que antígenos parasitarios son transmitidos *in útero* de la madre infectada hasta su feto, induciendo una respuesta inmune en ellos (10). Estos antígenos podrían ser moléculas liberadas por los tripomastigotes circulantes en sangre materna o por los amastigotes presentes en la placenta (2). Sin embargo, los mecanismos que subyacen en la capacidad de los patógenos intracelulares para inducir una respuesta inmune mediada por células *in útero* aún no han sido dilucidados (34). Es por ello que sería de gran interés realizar futuras investigaciones en las que se detecten células T CD8 y células NK a fin de conocer la fuente exacta de producción de IFN- γ , ya que en base a la función principal que cumplen las citocinas como mensajeros de comunica-

ción entre las células del sistema inmune, el total esclarecimiento de las complejas interacciones y el modo de acción de dichas proteínas; así como los mecanismos involucrados en la activación de una respuesta inmune celular en el feto podría tener prometedoras implicaciones terapéuticas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes (CDCHT), proyecto C-1305-05-03-B.

REFERENCIAS

1. OMS. La Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Nota descriptiva N-340, Mayo de 2010.
2. Carlier Y, Torrico F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi* from mechanism of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 6:767-771.
3. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Tellez T, Brutus L, Rodríguez P. Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas disease? *Trop Med Int Health* 2006; 11:628-635.
4. Rubio M, Howard J. Congenital Chagas disease II. Pathological findings in nine cases. *Bol Chil Parasitol*. 1968; 23:113-121.
5. Blanco SB, Segura EL, Gurtler RE. Control of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59:138-142.
6. Blanco SB, Segura EL, Cura EN, Chuit R, Tulian L, Flores I, Garvarino G, Villalonga JF, Gurtler RE. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health* 2000; 5:293-301.
7. Torrico F, Vega A, Suarez E, Rodríguez P, Torrico-Cruz M, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70:201-209.
8. Camus D, Carlier Y, Bina JC, Borojevic R, Prata A, Capron A. Sensitization to *Schistosoma mansoni* antigen in uninfected children born to infected mothers. *J Infect Dis* 1976; 134:405-408.
9. Carlier Y, Truyens C. Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. *Parasitol Today* 1999; 11: 94-99.
10. Hermann E, Truyens C, Vega C, Even J, Rodríguez P, Berthe A, Gonzalez E, Torrico F, Carlier Y. Human fetuses are able to mount an adult like CD8 T cell response. *J Infect Dis* 2002; 100:2153-2158.
11. Truyens C, Hermann E, Vega C, Rodríguez P, Vekemans J, Torrico F, Carlier Y. Respuesta inmune en neonatos no infectados nacidos de madres infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Venezol Med Trop* 2005; 38:96-100.
12. Zaretsky M, James A, Byrd W, Bawdon R. Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Am Coll Obstet Gynecol* 2004; 103:546-550.
13. Bell MJ, Hallenbeck JM, Gallo V. Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. *Pediatr Res* 2004; 56:541-546.
14. Vekemans J, Truyens C, Torrico F, Solano M, Torrino M, Rodríguez P, Alonso C, Carlier Y. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection upregulates capacity of uninfected neonate cells to produce pro and anti-inflammatory cytokines. *Infect Immun* 2000; 68:5430-5434.
15. Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* 1953; 20:191-207.
16. Brener Z. Observations on immunity to superinfections in mice experimentally inoculated with *Trypanosoma cruzi* and subjected to treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1962; 4:119-123.
17. Kotner J, Tarleton R. Endogenous CD4+ CD25+ regulatory T cells have a limited

- role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 2007; 75: 861-869.
18. Ferraz ML, Gazinelli RT, Alves RO, Urbina JA, Romanha AJ. Absence of CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in the treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:174-179.
 19. Dauby N, Alonso-Veiga C, Suarez E, Flores A, Hermann E, Córdova M, Tellez T, Torrico F, Truyens C, Carlier Y. Maternal infection with *Trypanosoma cruzi* and congenital Chagas disease induce a trend to a type 1 polarization of infant immune response to vaccines. *PloS Negl Trop Dis* 2009; 3:e571.
 20. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14:353-356.
 21. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 2001; 13:219-227.
 22. Hermann E, T Truyens C, Veiga C, Even J, Rodríguez P, Berthe A, Gonzalez E, Torrico F, Carlier Y. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon gamma in response to parasite antigens. *J Infect Dis* 2004; 189:1274-1281.
 23. Altemani AM, Bittencourt AL, Lana AM. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas disease: a qualitative and quantitative analysis. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:319-324.
 24. Moreno EA, Araujo M, Alarcón M, Luño de Yarbuh A, Araujo S, Borges R. Efecto de la infección chagásica aguda en ratas wistar gestantes. *Rev Cientif* 2006; 5:506-516.
 25. Adkins B, Leclere C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:553-564.
 26. Marchant A, Appay V, Van der Sande M, Dulphy N, Liesnard C, Kidd M, Kaye S, Ojuola O. Mature CD8 T lymphocytes response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest* 2003; 111:1747-1755.
 27. Aliberti JC, Cardoso MA, Martins G, Gazinelli R, Vieira L, Silva J. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 1996; 64: 1961-1967.
 28. Arantes RM, Marche HH, Bahia MT, Cunha FQ, Rossi MA, Silva JS. Interferon gamma induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am J Pathol* 2004; 164:1361-1368.
 29. 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. *J Immunol* 1996; 26:102-109.
 30. Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. Depletion of T cells subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas disease. *Infect Immun* 1994; 62:1820-1829.
 31. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114:103-110.
 32. Jacobs F, Chaussabel C, Truyens C, Leclercq V, Carlier Y, Goldman M, Vray B. IL-10 up-regulates nitric oxide synthesis by lipopolysaccharide (LPS) activated macrophages: improved control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Exp Immunol* 1998; 113:59-64.
 33. Martin DL, Tarleton RL. Antigen-specific T cells maintain an effectors memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2005; 174: 1594-1601.
 34. Hermann E, Alonso-Veiga C, Berthe A, Truyens C, Flores A, Cordova M, Moretta L, Torrico F, Braud V, Carlier Y. Human congenital infection with *Trypanosoma cruzi* induces phenotypic and functional modifications of cord blood NK cells. *Pediatr Res* 2006; 60:38-43.