

PROTECCIÓN DE RATONES CON ANTÍGENO DE *TRYPANOSOMA LEWISI* Y SUS FRACCIONES EN CONTRA DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Walterio García Fernández de LARA (1)

RESUMEN

Se demuestra que los ratones inmunizados con un extracto somático de *T. lewisi* son protegidos significativamente contra una infección experimental de *T. cruzi*. Se hizo cromatografía en columna con Sephadex G-100 del antígeno somático, para encontrar aquella o aquellas fracciones que ofrecerían una mayor protección en contra de la infección experimental de *T. cruzi*. Se concluye que el antígeno somático de *T. lewisi* produce una mayor protección que cualquiera de las fracciones obtenidas del mismo y se anota el resultado del análisis químico del antígeno y las fracciones obtenidas. Se discute igualmente el método utilizado para valorar el grado de infección en los animales de experimentación.

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones efectuadas en el campo de la inmunología sobre la enfermedad de Chagas son de trascendental importancia, ya que quizá en estos estudios se encuentre la solución al problema terapéutico de este padecimiento. Existe también la posibilidad de encontrar mejores métodos para lograr una inmunización activa que pudiera impedir el desarrollo del padecimiento. Se han utilizado cepas homólogas atenuadas para proteger contra infecciones experimentales de *T. cruzi* ^{7, 11, 14, 15, 16, 22, 20, 21}, así como extractos preparados con el mismo tipo de parásitos ^{12, 13} y toxinas homólogas, aunque estas últimas se han estudiado más desde el punto de vista tóxico y no del de protección ²³. GARCÍA & MÜHLFORDT ³ comunicaron la protección parcial, en contra de la infección experimental con *T. cruzi*, de ratones tratados previamente con el parásito vivo de una cepa heteróloga no patógena para el hombre, *T. lewisi*. Este tripanosoma es parásito exclusivo de la rata y sólo puede infectar al ratón bajo circunstancias especiales ^{9, 18}. En una comunicación posterior estos mismos Autores ²

demonstraron la existencia de varios componentes comunes entre los antígenos somáticos de *T. lewisi* y *T. cruzi*, lo cual podría explicar la capacidad protectora antes mencionada. Este hecho, apoyado además en las semejanzas que existen entre ambas especies, descritas hasta entonces ^{1, 26}, hacen pensar en la posibilidad de utilizar una cepa heteróloga para obtener una protección en contra de la infección de *T. cruzi*.

El objeto del presente trabajo es el de evaluar el grado de protección del antígeno somático de *T. lewisi*, así como el de las fracciones aisladas de éste, en contra de la infección experimental de *T. cruzi* en el ratón. También se discute el método empleado para valorar la infección.

MATERIAL Y METODOS

Cepas-Trypanosoma cruzi (Tepechitlán, México) aislada de un caso humano ²⁴ y mantenida por pases sucesivos en ratones de la cepa CFI.

(1) Prof. de Tiempo Completo, Depto. de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria. México 20, D.F., México

Trypanosoma lewisi (London) aislada por Fulton en Inglaterra y gentilmente enviada a México por el Prof. Mühlpfordt del Instituto de Enfermedades Tropicales de Hamburgo, Alemania. Esta cepa fué mantenida en cultivos en masa modificados para *T. lewisi*¹⁹, entre 19 a 25 días. Después de este tiempo se usaron para preparar el antígeno somático o resembrar nuevos medios para mantener la cepa.

Fraccionamiento — El antígeno somático o extracto crudo fué preparado según el método descrito por GARCÍA & col.² y analizado químicamente. Para determinar el contenido de proteínas totales se utilizó el método de LOWRY & col.¹⁰, el de carbohidratos por el método de la antrona⁵, el de ácido ribonucleico (RNA) por el método del orcinol⁶ y el de ácido desoxiribonucleico (DNA) por el de la 4-nitrofenilhidracina²⁶.

Después de ser analizado el antígeno de *T. lewisi*, se fraccionó 3.5 ml con un contenido protéico de 5 mg. El fraccionamiento se hizo por cromatografía en columna a través de Sephadex G-100 (Upsala, Suecia), utilizando 500 ml de agua destilada como eluyente.

La columna tenía una altura de 65 cm. y un diámetro de 1.8 cm. Las fracciones se recibieron en un colector RSCO modelo 1205 D3 en colúmenes fraccionados de 5 ml, obteniéndose un total de 100 tubos. Cada tubo fué leído en un espectrofotómetro PMQ 11 Zeiss a 260 y 280 m μ .

Inmunización — Se utilizaron ratones blancos de la cepa CFI que fueron agrupados de la siguiente manera:

Grupo I — Cinco ratones inoculados con *T. lewisi* vivos a razón de 30×10^6 como dosis total por ratón, fraccionada en 5 aplicaciones, una cada 5 días.

Grupo II — Diez ratones tratados con antígeno somático de *T. lewisi*. Como dosis total se administraron 2.5 mg de proteína por ratón, siguiendo el mismo patrón para la aplicación que en el grupo anterior.

Grupo III — Seis ratones tratados con la fracción I del antígeno somático. Como dosis

total se administraron 2.5 mg de proteína por ratón, siguiendo el mismo patrón de aplicación que en el Grupo II.

Grupo IV — Nueve ratones tratados con la fracción II del antígeno somático, las dosis total fué de 2.5 mg de proteína y se aplicaron en la misma forma que en los grupos anteriores.

Grupo V — Control: Diez ratones. Este grupo no recibió ningún tratamiento.

Las vías de inoculación en los Grupos I a IV fueron las siguientes: Las primeras dos administraciones en pulpejos de las patas, la tercera y cuarta intramuscular y la quinta por vía intraperitoneal.

Cinco días después de la última dosis "inmunizante", los ratones (Grupos I-V) fueron infectados por vía intraperitoneal, con 1×10^6 de *T. cruzi* metacíclicos obtenidos de ratones infectados con la cepa Tepechitlán.

Valoración de la infección

La parasitemia fué valorada diariamente contando los parásitos en fresco, en cámara cuenta glóbulos y después de un mes se sacrificaron los animales, extrayéndoseles el corazón para hacer cuenta de nidos de leishmanias en miocardio. El corazón fué fijado en formol al 10%. Se hicieron cortes histológicos con un grosor de 5 μ y se tiñieron con el método de hematoxilina de HARRIS⁴. Se observaron 1000 campos por corte, con objetivo 40 X y ocular 8, lo que prácticamente permitió revisar el corte en su totalidad. Los cortes se hicieron a 20 niveles distintos, tomando dos cortes en cada nivel.

RESULTADOS

El análisis químico del antígeno total de *T. lewisi*, así como el de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna con Sephadex G-100, se encuentra resumido en la Tabla I.

En la Fig. 1 se muestra el fraccionamiento de 5 mg de proteína somática de *T. lewisi*. Se obtuvieron 2 fracciones, las cuales fueron liofilizadas y estandarizadas a 500 μ g de contenido protéico para los estudios biológicos.

TABLA I

Análisis químico del antígeno somático de *Trypanosoma lewisi* y de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna Sephadex G 100
Por ciento (*)

Material	Proteína	Azúcares	DNA	RNA
Antígeno somático	19,6	2,4	7,8	2,0
Fracción I	1,2	0,34	0,06	0,4
Fracción II	5,4	1,2	0,12	0,4

(*) En base a peso seco de la muestra

La Tabla II muestra el número total de nidos de leishmanias encontrados en los cortes histológicos de los corazones de los animales utilizados en el trabajo, así como también el promedio por ratón \pm el error estandar. En ella podemos observar que los ratones que tuvieron un menor número de nidos de leishmanias fueron aquellos tratados con *T. lewisi* vivos, en seguida aquellos tratados con el antígeno somático. Por otra parte las fracciones no mostraron un valor significativo, en el grado de protección.

DISCUSION Y COMENTARIOS

Una posible solución al problema terapéutico en la enfermedad de Chagas podría ser

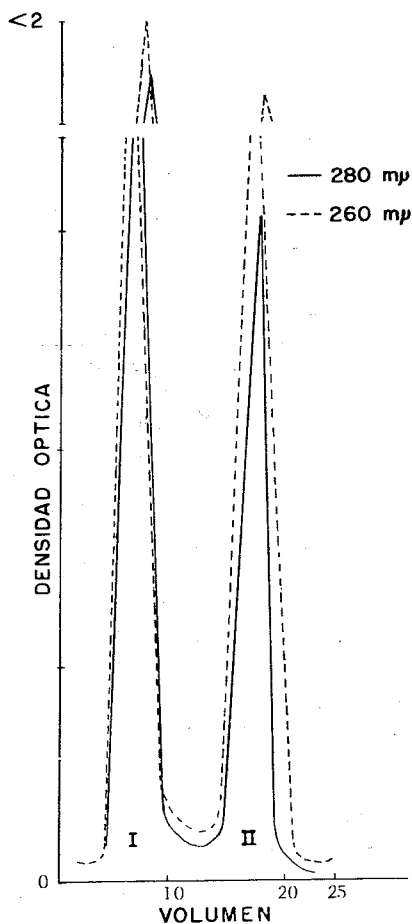


Fig. 1

TABLA II

Grupo	Material inmunizante	No. de nidos de leishmania en miocardio	Promedio \pm error estandar	p(*)
Control	ninguno	1390	139 \pm 44.8	—
I	<i>T. lewisi</i> vivos	4	0.8 \pm 0.49	< 0.001
II	Ag. somático (<i>T. lewisi</i>)	142	14.2 \pm 6.37	0.02
III	Fracción I	433	72.2 \pm 43.4	> 0.5
IV	Fracción II	764	85 \pm 45	> 0.3

(*) Los valores de p fueron determinados por medio de la prueba t de student por comparación del grupo en estudio y el grupo control.

la inmunización de los individuos en las zonas endémicas. Hasta ahora sólo se ha demostrado un grado variable de protección cuando se utilizan cepas homólogas atenuadas^{7, 11, 14, 15, 16, 22, 20, 21} o bien extractos homólogos^{12, 13}, también por transferencia de anticuerpos protectores mediante sueros de ratones tratados con cepas atenuadas⁸. Por otro lado, se ha publicado un trabajo en el que se comunica la aplicación de una vacuna viva avirulenta de *T. cruzi* a dos individuos, en los cuales solamente se demostró la presencia de anticuerpos¹⁷, no existiendo ninguna indicación de que éstos fueran protectores. El peligro que pudiera presentar el uso de cepas atenuadas podría ser el que en un momento dado, éstas recuperan su virulencia y producen el padecimiento que se trata de evitar.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que de los antígenos usados, específicamente el de *T. lewisi* vivo y el antígeno somático, protegen a los ratones contra una infección experimental de *T. cruzi*, y que en la práctica ambos pudieran tener el mismo valor y el mismo margen de seguridad.

Por otro lado, no hay datos comparativos que nos hagan suponer que las cepas homólogas producen una mayor protección que las cepas heterólogas.

La cepa de *T. cruzi* (Tepechitlán) no se comportó con la virulencia descrita por los Autores que la aislaron²⁴. Esto se podría explicar por la atenuación de la virulencia que haya sufrido dicha cepa, debido a los pases de ratón a ratón utilizados para su mantenimiento en el laboratorio.

Inicialmente se realizaron cuentas de parásitos utilizando métodos de observación de sangre en fresco y contando los parásitos por campo, como ha sido recomendado por varios Autores, al comparar este método con el de cuenta de parásitos en cámara de Neubauer, en aquellos ratones que sobrevivieron a la infección con *T. cruzi* se encontró que no existía relación entre ambos métodos, por lo que decidimos utilizar la cuenta de nidos de leishmania en miocardio. Este método permite valorar las lesiones producidas por el parásito y por lo tanto dar una prueba más feaciente del grado de protección de los antígenos o de la infectividad del parásito.

SUMMARY

A Trypanosoma lewisi antigen or its fractions as a mean of protection of mice against the experimental infection with Trypanosoma cruzi

The results here presented showed that a significant protection against experimental infection with *Trypanosoma cruzi* can be obtained with a somatic extract obtained from *Trypanosoma lewisi*. The *T. lewisi* extract contained protein, carbohydrate and nucleic acid material. When the somatic antigen was fractioned through Sephadex G-100, two fractions were obtained. They did not however, protect mice against experimental infection with *T. cruzi*.

AGRADECIMIENTOS

El Autor desea hacer público su agradecimiento a la Srita. Biol. Georgina Juárez Gallegos por su asistencia técnica en este trabajo.

REFERENCIAS

1. DANFORTH, W. F. — *Respiratory Metabolism*. Oxford, Pergamon Press, Edit. Chen, T. *Res. Protozoology* 1:201-306, 1967.
2. GARCÍA, W.; OELERICH, S. & MÜHLFORDT, H. — Relaciones Inmunológicas entre *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma lewisi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11: 67-70, 1969.
3. GARCÍA, W. & MÜHLFORDT, H. — Infección de *Trypanosoma cruzi* en ratones después de su tratamiento con *Trypanosoma lewisi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:13-18, 1969.
4. HARRIS, H. F. — On the rapid conversion of haematoxylin into, Haematein in staining Reactions. *J. A. PPL. Microscop.* 3:777-780, 1900.
5. HASSID, W. Z. & ABRAHAM, S. — *In Methods in Enzymology*. Edited by S. P. Colowick & N. O. Kaplan. New York, Academic Press 3:35, 1957.
6. KABAT, E. A. — *Kabat and Mayer's Experimental Immunochimistry*. 2nd. Ed. Springfield, Charles C. Thomas, III; 1961, p. 530.
7. KAGAN, I. G. & NORMAN, L. — Immunological studies on *Trypanosoma cruzi* III Duration of acquired immunity in mice initially infected with a Norteamerican strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 108:213-217, 1961.

8. KAGAN, I. G. & NORMAN, L. — Passive transfer and pathogenicity experiments with an American and a Chilean strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasit.* 48(Suppl.):31, 1962.
9. LINICOME, D. R. — Serial Passage of *Trypanosoma lewisi* in the heterologous mouse host. I — Developmental history during the transfer in colorically restricted host. *J. Protozool.* 6:310-315, 1959.
10. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:165, 1951.
11. MARR, J. S. & PIKE, E. H. — The protection of mice by "Corpus Christi" strain of *Trypanosoma cruzi* when challenged with "Brasil" Strain. *J. Parasit.* 53:657-659, 1967.
12. MENEZES, H. — The use of adjuvant in the vaccination of mice with lyophilized "*Trypanosoma cruzi*". *Hospital (Rio)* 68: 1341-1346, 1965.
13. MENEZES, H. — The effect of phenolated "vaccines" against experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 2:59-66, 1968.
14. MENEZES, H. — Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:1-4, 1968.
15. MENEZES, H. — Active immunization of mice with the avirulent strain of *Trypanosoma cruzi* against heterologous virulent strain of the same parasite. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:335-342, 1969.
16. MENEZES, H. — Active Immunization of dogs with a non virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:258-263, 1969.
17. MENEZES, H. — Aplicação da vacina viva avirulenta de *Trypanosoma cruzi* em seres humanos. (Nota-prévia). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:144-154, 1971.
18. MÜHLPFORDT, H. — Untersuchungen über die experimentelle *Trypanosoma lewisi* Infektion der Maus. *Z. Tropenmed. Parasit.* 19:73-82, 1968.
19. NAKAMURA, M. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in a protein free dialysate medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125:779-780, 1967.
20. NORMAN, L. & KAGAN, I. G. — Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. II — Acquired immunity in mice infected with avirulent American strains of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 107:168-174, 1960.
21. NUSSENZWEIG, V. N.; KLOETZEL, J. & DEANE, L. M. — Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasit.* 14:233-239, 1963.
22. PIZZI, T. & PRAGER, R. — Inmunidad a la sobreinfección inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 7:20-21, 1952.
23. SENECA, H. — Active immunization of mice with Chagas-toxin. *Nature (London)* 209: 309-310, 1966.
24. TAY, Z.; BIAGI, F. F. & BIAGI, B. A. M. — Estado actual de conocimientos sobre triatomas y enfermedad de Chagas en el estado de Zacatecas. *Medicina (Méx.)* 1032:121-128, 1968.
25. WEBB, J. M. & LEVY, H. B. — New developments in the chemical determination of nucleic acids. *Meth. Biochem. Anal.* 6:1, 1968.
26. WEUYOU, C. M. — *Protozoology*. London, Bailliere Fendall and Cassel Ltd. 1:486, 1965.

Recebido para publicação em 28/1/1972.