

## TRYPANOSOMA CRUZI: ACCIÓN DE INMUNOSUEROS DE CONEJO SOBRE EL CULTIVO DE EPIMASTIGOTES EN MEDIOS BIFÁSICOS

S. M. GONZALEZ-CAPPA (1); U. J. PESCE (3); A. I. CANTARELLA (2) y G. A. SCHMUNIS (1)

### RESUMEN

Los inmunosueros obtenidos en respuesta a la infección por *Trypanosoma cruzi* (sueros anti-E y anti-T), se comportan de manera similar a los preparados con antígenos obtenidos con parásitos destruídos (suero anti-HTT) al actuar sobre formas de cultivo de *T. cruzi*. Todos producen aglutinación grosera de los parásitos con pérdida de la morfología y motilidad, pudiendo llegar a la total destrucción. En ocasiones se registra una multiplicación tardía especialmente en cultivos que contienen suero anti-T, la cual no se puede atribuir a selección de población ni a variación antigénica. Las modificaciones sufridas por los parásitos por acción de los inmunosueros son irreversibles después de 3 horas de incubación. Hasta los 60 minutos sólo se obtiene un retardo del crecimiento. La acción inhibitoria del crecimiento pudo absorberse con epimastigotes vivos, polvo de epimastigotes y la fracción insoluble del polvo de epimastigotes. La fracción soluble prácticamente carece de actividad. La acción de los inmunosueros su acción sobre el crecimiento de los epimastigotes no es modificada por la dialización previa de los sueros; tampoco es cepa específica. Está ligada a la fracción IgM en el período agudo de infección y a la IgG en el período crónico.

### INTRODUCCION

La forma epimastigote del *Trypanosoma cruzi* es comúnmente hallada en el huésped invertebrado pero no en el mamífero. Esta forma es también la predominante en los medios de cultivo comúnmente utilizados para la multiplicación *in vitro* de este parásito. Varios Autores han descrito la capacidad lítica que sueros normales de diversas especies poseen sobre esta forma *in vitro* <sup>9,13,17,18</sup>. Este hecho, unido a la fácil destrucción de este estadio del parásito por los macrófagos en el sitio de inoculación, hace que los epimastigotes posean una capacidad infectante nula o sumamente baja <sup>12,15</sup>. Entre los sueros normales de las especies ensayadas, todos los sue-

ros de mamífero, a excepción del suero de ratón, lisan epimastigotes. Esta actividad lítica inespecífica es eliminada inactivando los sueros a 56°C durante 30 minutos <sup>13</sup>. Por supuesto, los inmunosueros específicos poseen también acción lítica sobre esta forma <sup>3,21</sup>. Para poner en evidencia el mecanismo de inmunólisis del epimastigote, se han realizado estudios *in vitro* tanto con sueros normales como con inmunosueros llegando los Autores a la conclusión de que éste es un fenómeno complemento dependiente <sup>3</sup>. Sin embargo, si consideramos que Rubio comunica para este parásito acción lítica inespecífica *in vitro* con sueros de carnero, carentes de C<sub>2</sub> y C<sub>4</sub>, se plan-

Este trabajo fue realizado con fondos de la Comisión para el Estudio Integral de la Enfermedad de Chagas de la Universidad de Buenos Aires. Fue presentado parcialmente en XVIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas, en noviembre de 1973.

(1) Carrera del Investigador, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

(2) Becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

(3) Becario de la Universidad de Buenos Aires (U.B.A.)

Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, U.B.A., Paraguay 2155, Piso 13, Buenos Aires, Argentina

tea la posibilidad de otros mecanismos de lisis distintos del clásico antígeno-anticuerpo-complemento dependiente, o quizás de la participación del camino alternativo de activación de complemento según la especie animal a estudiarse<sup>3</sup>.

Para el género *Leishmania*, también se ha demostrado la existencia de actividad lítica inespecífica en sueros de distintas especies, pero aquí también se plantean algunos interrogantes en relación a la participación en el mecanismo de lisis de factores diferentes de los inmunológicos, que podrían producir un efecto similar<sup>14</sup>. En cuanto a la acción de inmunosueros específicos para este género, analizada sobre un soporte de medio de cultivo que permite el seguimiento del desarrollo de los parásitos sembrados en él, ha hecho posible la caracterización de especies<sup>2,11</sup>.

En relación al *T. cruzi*, ya en 1958 Adler dice que la acción producida por un inmunosero específico sobre un soporte de cultivo permite analizar efectos que no son factibles de ponerse en evidencia por otro método<sup>1</sup>. En dicho trabajo el Autor describe con minuciosidad las alteraciones morfológicas y la acción inhibitoria del crecimiento que diversos inmunosueros de conejo presentan sobre las formas de cultivo de *T. cruzi*. Estos estudios sugieren implícitamente la intervención de anticuerpos; sin embargo, éstos no se han caracterizado.

El propósito del presente trabajo es verificar si las alteraciones morfológicas y la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes en presencia de inmunosueros específicos de conejos es producida por anticuerpos, así como analizar si estos fenómenos necesitan de la integridad del sistema complemento, cuando el estudio se realiza en un soporte nutritivo capaz de permitir, en condiciones normales, la multiplicación del parásito.

## MATERIAL Y METODOS

### Inmunosueros

Se prepararon inmunosueros específicos en conejos blancos de 2 Kg. de peso a los que se les inoculó *Trypanosoma cruzi* de la cepa Tulahuén obtenidos de cultivos bifásicos o de sangre de ratón.

En el caso de las inmunizaciones con cultivos se inocularon conejos con un total de 9 dosis, inyectándose los bisemanalmente y alternativamente por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa e intraperitoneal. Se inocularon 3 conejos con homogenato total (HT), el cual fue preparado con 1 volumen de epimastigotes sedimentados a 10.000 g, durante 10 minutos, adicionados de 1 volumen de buffer de fosfato 0.05 M, pH 8, sometidos a presión-descompresión en un fraccionador celular<sup>6</sup>. Cada animal recibió 50-60 mg de proteínas en cada dosis<sup>8</sup>.

De manera semejante, pero empleando epimastigotes vivos (E) se inmunizaron otros 3 conejos; cada uno de ellos recibió  $0.5-1 \times 10^{10}$  epimastigotes en cada inoculación.

Un tercer lote de conejos, en número de 8, se inoculó con  $5 \times 10^6$  tripomastigotes (T) por vía intraperitoneal. De estos conejos se tomó una primera muestra de sangre a los 15 días después de infectados.

Los 3 lotes de animales se sangraron a blanco a los 60 días de la última dosis inmunizante o infectante. Los sueros fueron esterilizados a través de filtros Seitz de  $0.4 \mu$  de poro, fraccionados en un volumen de 1,5 ml y guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Suero normal de conejo esterilizado, fraccionado y conservado en forma similar a los anteriores se empleó como control.

### Medios de Cultivo

Para todos los experimentos se utilizaron cultivos bifásicos con 10% de sangre en la base<sup>16</sup>.

Cada experimento incluyó cultivos de los inmunosueros a estudiarse, así como controles con suero normal de conejo y sin el adiciónamiento de suero. Inóculos de epimastigotes provenientes de un cultivo bifásico de 4 días de crecimiento fueron transferidos a medios frescos ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) a los que ya se les había adicionado el inmunosero o el suero normal correspondiente, en una dilución 1:10, en el sobrenadante.

La cepa de parásitos empleada para la mayoría de los experimentos fue la Tulahuén, pero en algunos casos se realizaron pruebas con las cepas Corpus Christi (CC) y L<sup>7</sup>.

Los cultivos se observaron en forma fresca al microscopio, en algunos experimentos diariamente, en otros cada 48-72 horas, registrándose sus características más importantes (morfología y motilidad) y haciéndose recuento de las formas libres.

#### **Inactivación por calor e investigación de una posible selección de población resistente**

Alícuotas de sueros normales y de cada uno de los inmunosueros obtenidos a los 60 días, se inactivaron a 56°C durante 30 minutos ensayándose luego su actividad sobre las formas epimastigotes en cultivos, comparativamente con sueros no inactivados. Alícuotas de inmunosueros anti-HT y anti-E se inactivaron también a 65°C, pero en este caso el suero se diluyó 1:10 en el medio de cultivo a utilizarse como sobrenadante.

De cada uno de los inmunosueros ensayados, no inactivados e inactivados a 56°C, así como de los cultivos crecidos en presencia de suero normal y sin sueros, se recogió al 5to. día una muestra de 1 ml que se sedimentó y lavó 3 veces, resemebrándose (1:3 aproximadamente) y estudiándose su posterior evolución en medio in suero.

De los cultivos crecidos originalmente en presencia de suero anti-T inactivado (que suele dar crecimiento tardío — Ver Resultados) y que previo lavado se habían inoculado en medio de cultivo sin suero, se obtuvieron muestras también al 5to. día, las que se sembraron en cultivos: a) sin suero, b) con suero anti-E inactivado a 56°C, y c) con suero anti-T inactivado a 56°C, con el fin de verificar si se había seleccionado una población resistente a este último suero.

#### **Estudio cinético de la acción de los inmunosueros**

Para este estudio se utilizó sólo suero anti-E.

Se prepararon cultivos bifásicos sembrados con epimastigotes y adicionados de 1:10 de inmunosero o suero normal. Alícuotas de estos cultivos de 2 ml cada una se retiraron después de 1, 3, 6, 24 y 72 horas. Estas muestras se sedimentaron y se lavaron para luego resemebrarse en medios sin suero. Una pequeña

gota de estas muestras se utilizó para la observación microscópica directa.

#### **Absorción específica**

Alícuotas de suero anti-E fueron absorbidas durante 1 hora a 37°C y una noche a 4°C:

- 1) 30 mg de **polvo total de epimastigotes** (rotos por congelamiento-descongelamiento y liofilizados), por cada ml de suero.
- 2) La **fracción insoluble** de 30 mg de polvo de epimastigotes, obtenida por homogeneización manual en potter, de los 30 mg de polvo en 10 ml de solución salina de buffer de fosfatos 0.15 M, pH:7.2, con posterior centrifugación a 10.000 g, 10 minutos; el sedimento se lavó 3 veces y luego se utilizó para la absorción de 1 ml de suero.
- 3) La **fracción soluble** de 30 mg de polvo de epimastigotes que se obtuvo del primer sobrenadante de la homogeneización mencionada en el punto anterior, el cual, previa liofilización, se utilizó para absorber 1 ml de suero.
- 4) 300 mg de **peso húmedo de epimastigotes** obtenidos por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos, por ml de suero (equivalen a los 30 mg de polvo).
- 5) Suero anti-E no absorbido pero tratado 1 hora a 37°C y una noche a 4°C, fue incluido como control.

#### **Diálisis**

Estos ensayos se realizaron con suero anti-HT. Alícuotas de suero normal e inmunosero fueron dializadas a 4°C durante 48 horas contra agua destilada o solución salina de buffer de fosfatos 0.15 M, pH: 7.2, ensayándose posteriormente su acción sobre los epimastigotes incorporando estos sueros diluidos 1:10 a la fase líquida de los medios de cultivos. Se incluyeron los controles correspondientes (suero anti-HT no dializado mantenido 48 horas a 4°C, suero recién descongelado y suero normal).

#### **Fraccionamiento de sueros anti-T. cruzi**

Para la obtención de fracciones IgM e IgG se utilizaron los sueros obtenidos de conejos infectados con tripomastigotes y san-

grados a los 15 y 60 días postinfección (suero anti-T) así como muestras de suero anti-HT. Las globulinas de estos sueros se precipitaron con sulfato de amonio<sup>20</sup> y luego se reconstituyeron a la mitad del volumen original. Posteriormente se fraccionaron muestras de 4 ml utilizándose una columna de Sephadex G-200 (100 x 2,5 cm) equilibrada con una solución de cloruro de sodio 0.2 M tamponada con 0.5% de buffer tris-borato 0.5 M, pH: 8.4. Este mismo buffer se utilizó para la elución de las muestras, realizándose todo el proceso a una temperatura entre 15° y 18°C. La concentración relativa de proteínas para cada fracción de 5 ml se estableció con un espectrofotómetro Zeiss a 280nm.

Se determinaron 2 fracciones, IgM e IgG, según FLODIN & KILLANDER<sup>5</sup>, las que previa liofilización, se hidrataron con agua destilada a los 2/3 del volumen original y se dializaron durante 48 horas contra buffer de fosfatos 0.15 M, pH: 7.2. La pureza de estas fracciones se determinó por inmunoelectroforesis utilizándose como antígeno antiglobulina total de conejo preparada en cabra (comercial) y sólo se evaluaron aquellas fracciones que no evidenciaron contaminación por este método.

#### **Acción de inmunosero de conejo anti-Tulahuén sobre varias cepas de *T. cruzi***

Para estos ensayos se emplearon las cepas CC, L y Tulahuén las que se cultivaron en medios adicionados de suero normal o de suero anti-HT preparado con la cepa Tulahuén. La acción del inmunosero se evaluó comparativamente para las 3 cepas.

### **RESULTADOS**

A la observación microscópica directa en los cultivos sin adición de suero se hallaron formas libres en su mayoría, lo que permitió una adecuada evaluación de las curvas de crecimiento con valores ascendentes (Fig. 1 y Fig. 2). En algunos casos se encontraron pequeñas "rosetas de crecimiento".

El agregado de suero normal determinó una disminución del número de parásitos durante las primeras 24-48 horas, más manifiesto para el suero sin inactivar que para el inactivado. Posteriormente, la curva de crecimiento fue también ascendente (Fig. 1). Estos cul-

tivos, en ocasiones, presentaron escasa aglutinación pero con conservación de la morfología y movilidad de los epimastigotes. En los cultivos con inmunosueros se encontraron masas aglutinadas de parásitos que no presentaban la morfología típica de epimastigotes. Frecuentemente se veían masas en las que no se podía distinguir morfología conservada en la parte central, pero conservaban algunos epimastigotes en su perifería. Algunas de estas masas presentaban escasa motilidad, otras se encontraban absolutamente inmóviles y en su mayoría iban a la destrucción (Figs. 3, 4 y 5).

Cuando las masas aglutinadas se destruían totalmente lo hacían entre el 6to. y 8vo. día. Hasta el 5to. día en general existían siempre masas con algo de motilidad. En algunos casos se observaban formas libres en cantidades mínimas que podían o no conservar su morfología aunque presentaban poca o nula motilidad. Pero, tardíamente (generalmente entre el 10mo. y 14vo. día) podía aparecer una multiplicación con curvas ascendentes y aparente duplicación normal de los parásitos. Esta se presentó con más frecuencia en los cultivos que incluían suero anti-T y con este suero en algunos experimentos la inhibición fue de sólo 3 a 4 días (Fig. 1 y Tabla I Grupo A). (Los Resultados presentados en la Tabla I corresponden al número de formas libres de parásitos expresado por ml de medio).

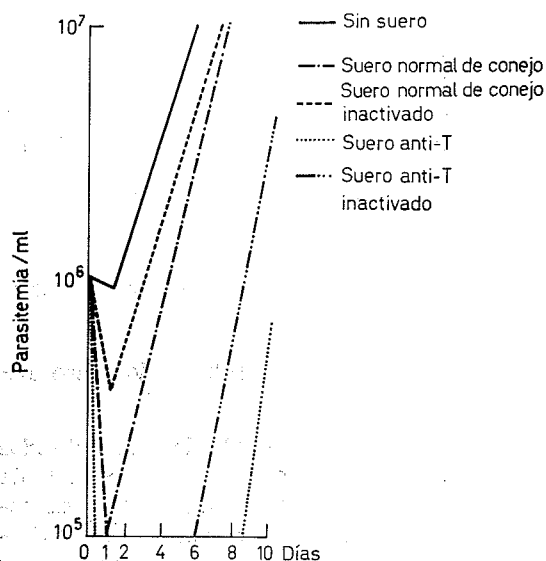


Fig. 1 — Curvas de crecimiento registradas en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* sin agregado o con agregado de suero de conejo normal o inmune.

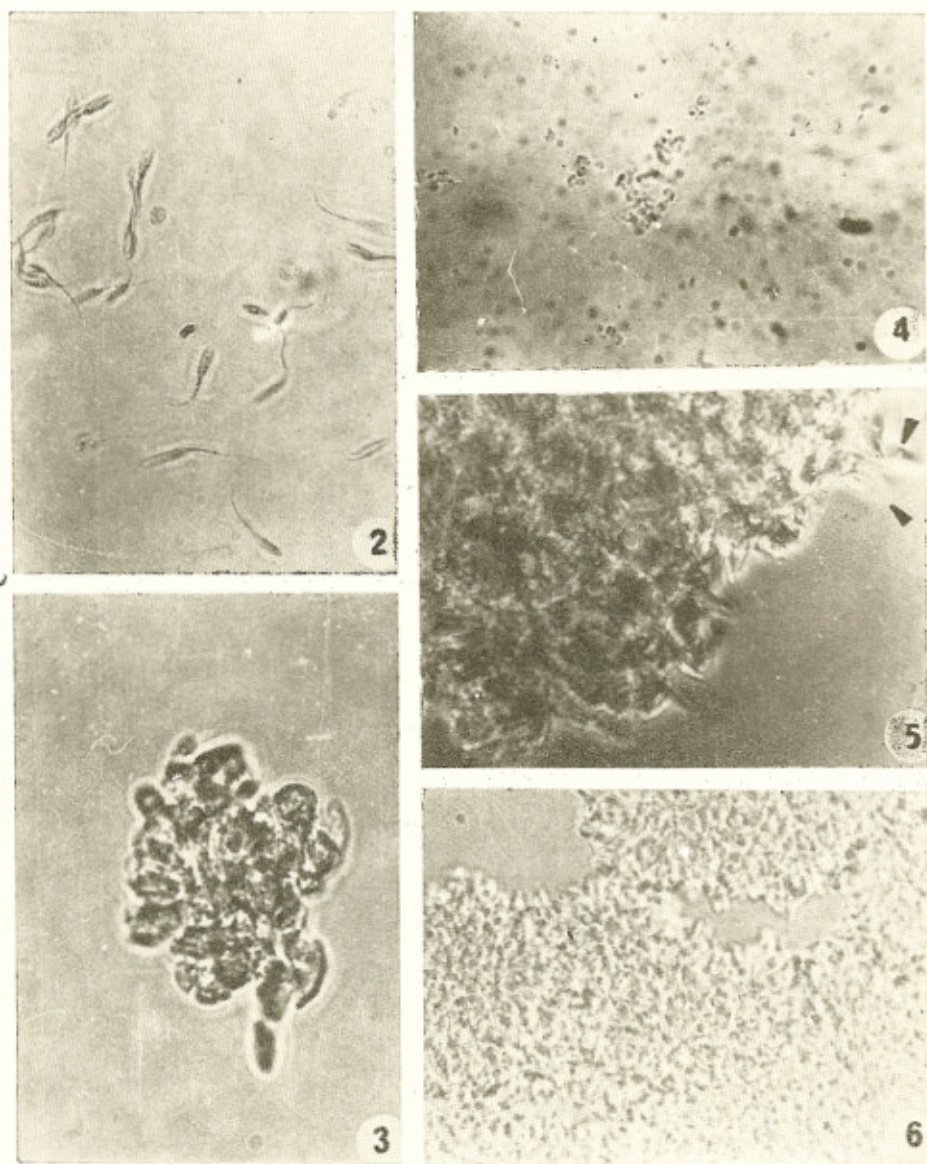


Fig. 2 — *T. cruzi*: Epimastigotes (cultivo sin suero). Fig. 3 — *T. cruzi*: Cultivo de epimastigotes con inmunosuero de conejo — Aglutinación gruesa. Fig. 4 — *T. cruzi*: Cultivo de epimastigotes con inmunosuero de conejo — Parásitos destruidos. Fig. 5 — *T. cruzi*: Detalle de una masa aglutinada. En el borde pueden apreciarse algunas formas con morfología parcialmente conservada (↘). Fig. 6 — *T. cruzi*: Crecimiento de tipo «Roseta gigante» en cultivo adicionado de inmunosueros de conejo absorbido con la fracción soluble de polvo de epimastigotes.

La inactivación de los inmunosueros a 56°C ó a 65°C no modificó la actividad de los sueros anti-HT. En el caso de los sueros anti-E inactivados a 56°C sólo en un experimento de tres realizados, se registró crecimiento tardío. En los dos restantes y en dos realizados con

inmunosueros inactivados a 65°C no hubo modificaciones con relación a la actividad mostrada por el suero no inactivado.

En el caso de los inmunosueros anti-T la acción inhibitoria se manifestó durante los primeros días de los cultivos, pero luego se pro-

TABLA I  
Acción de inmunosueros de conejo sobre cultivos de epimastigotes de T. cruzi

DÍAS	MEDIOS			DE			CULTIVO			GRUPO
	S.S.	S.N.	S.N.i.	anti-HT	anti-HTi	anti-E	anti-Ei	anti-T	anti-Ti	
3ro.	4.0x10 <sup>6</sup> (*)	1.5x10 <sup>6</sup>	2.6x10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	
5to.	9.5x10 <sup>6</sup>	4.6x10 <sup>6</sup>	7.9x10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	0.6x10 <sup>6</sup>	A
8vo.	5.4x10 <sup>7</sup>	2.1x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	0.1x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>6</sup>	
10mo.	N.H.	N.H.	N.H.	-	-	-	-	0.7x10 <sup>6</sup>	3.2x10 <sup>6</sup>	
del grupo A al 5to. día se recogió una muestra en cada caso, que se lavó y sembró en medios sin suero										
3ro.	4.8x10 <sup>6</sup>	2.0x10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	0.7x10 <sup>6</sup>	
5to.	7.1x10 <sup>6</sup>	3.9x10 <sup>6</sup>	6.8x10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	1.4x10 <sup>6</sup>	B
8vo.	N.H.	N.H.	N.H.	-	-	-	-	-	3.3x10 <sup>6</sup>	
al 5to. día del cultivo del grupo B proveniente de anti-Ti se sembró en medios S.S., anti-Hti y anti-Ti										
3ro.	0.37x10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
5to.	0.75x10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
7mo.	1.3 x10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	C
14vo.	1.2 x10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	2.7x10 <sup>6</sup>	

S.S.: Sin suero; S.N.: Suero normal; S.N.i.: Suero normal inactivado; anti-HT: Suero anti homogenato total; anti-HTi: Suero anti homogenato total inactivado; anti-E: Suero anti epimastigote; anti-Ei: Suero anti epimastigote inactivado; anti-T: Suero anti Tripomastigote; anti-Ti: Suero anti Tripomastigote inactivado; N.H.: No hecho.

(\*) N° de parásitos/ml.

En el grupo A, se observa que con el Suero anti-T aparece crecimiento tardío; en el B, se aprecia que las masas aglutinadas, lavadas y transferidas a medio de cultivo sin suero, no crecen, registrándose solo multiplicación en los controles y con suero anti-T inactivado. En el grupo C, se demuestra que la población recuperada de cultivo con suero anti-T no es la población resistente.

TABLA II

Acción de inmunosuero y fracciones sobre cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

MUESTRA DÍAS	S.T	S.T.T.	P.T.	IgM	IgG	S.S.	
2do.	-	++	-	++	-	++	S.anti-HT
4to.	-	+++	-	+++	-	+++	
7mo.	-	N.H.	+	N.H.	++	N.H.	
2do.	-	N.H.	-	-	+	++	S.anti-T 15 días
4to.	-	N.H.	-	-	+	++	
7mo.	-	N.H.	-	-	++	+++	
9no.	-	N.H.	-	-	+++	+++	
14vo.	-	N.H.	-	-	N.H.	N.H.	
2do.	-	N.H.	-	+	-	++	S.anti-T 60 días
4to.	-	N.H.	-	++	+	+++	
7mo.	+	N.H.	+	N.H.	++	N.H.	

S.T.: Suero Total

P.T.: Precipitado total

S.S.: Sin suero

+: del orden de  $10^5$  epimastigotes  
 ++: " " "  $10^6$  epimastigotes  
 +++: " " "  $10^7$  epimastigotes

S.T.T.: Suero total tratado como las fracciones en lo que a temperatura y diluciones se refiere

N.H.: No hecho

dujo en los mismos una multiplicación de los parásitos tanto con los inmunosueros no inactivados como con los inactivados. En este caso, en el cultivo con inmunosuero inactivado el crecimiento tardío generalmente aparecía más temprano que en los no inactivados.

Cuando los parásitos libres o sus masas aglutinadas (según provinieran de cultivos sin o con suero normal, o con suero inmune), después de 5 días de crecimiento se lavaron y sembraron en cultivos sin adición de suero, sólo aquellos que al 5to. día presentaban formas libres (cultivos controles y provenientes de cultivos con inmunosueros anti-T inactivados) crecieron normalmente (Tabla I Grupo B). Los cultivos que originalmente se habían sembrado con inmunosuero anti-T inactivado, y que al ser lavados y sembrados sin suero crecieron normalmente, cuando fueron pasados a nuevos medios se comportaron como la población original: en cultivos sin adición de suero, el crecimiento fue normal, en

medio con suero anti-HT inactivados a 56°C al día 14 sólo se veían detritus, y en aquellos con suero anti-T inactivados a 56°C se detectó nuevamente inhibición en los primeros días (hasta el 7mo.) pero en el día 14 el número de formas libres y móviles era considerable (Tabla I Grupo C).

Esta actividad aglutinante de los sueros que en la mayoría de los casos llevó a la destrucción de las masas de parásitos aglutinados la llamaremos de aquí en adelante "acción inhibitoria del crecimiento".

En los experimentos de cinética de esta acción inhibitoria, se observó que para que ésta fuese irreversible era necesario un tiempo mínimo de incubación de 3 horas en presencia de los inmunosueros. Las muestras obtenidas después de 3 horas ó más de incubación, mostraron masas aglutinadas, y los cultivos sembrados con muestras incubadas durante este tiempo dieron una destrucción total de los

mismos ya a los 5 días. El material incubado sólo una hora presentó aglutinación pero además numerosas formas libres a la observación directa: lavados y resemebrados, presentaron durante los primeros días algunas masas aglutinadas que incluían formas móviles y otras masas amorfas. Sin embargo, había formas libres numerosas y al 5to. día presentaban un aspecto similar al que tenían los cultivos adicionados de suero normal.

En lo que respecta a la absorción de la capacidad de inhibición del crecimiento de los cultivos, ésta fue muy buena cuando se realizó con epimastigotes vivos. El polvo total de epimastigotes también fue efectivo, así como el material insoluble obtenido de él. En lo que al material soluble respecta, la absorción no fue adecuado pero el aspecto del cultivo fue diferente al presentado por los controles y los sueros adsorbidos con los otros 3 materiales: si bien presentaba formas libres en cantidades relativamente bajas, las masas de parásitos se presentaban "aglutinadas" con el aspecto de "gigantescas rosetas" (Fig. 6).

Cuando se ensayó la actividad de las muestras de suero dializadas, se observó que las mismas conservaban la actividad inhibitoria del crecimiento, comportándose en forma semejante a las muestras controles no dializadas.

Con respecto a la capacidad inhibitoria de crecimiento y a su probable relación con alguna globulina, se determinó que el suero total anti-HT sometido a tratamientos de diluciones, concentraciones y cambios de temperatura perdió su actividad. Sin embargo, las globulinas precipitadas, así como las fracciones la conservaron al menos parcialmente. En este suero la acción inhibitoria se pudo relacionar con la fracción IgG. La diferencia que esta fracción presentó con respecto al inmunosuero total fue que la fracción inhibió sólo en los primeros días, permitiendo el crecimiento tardío. El suero anti-T de 15 días presentó actividad en relación a la fracción IgM en forma duradera. El suero anti-T de 60 días presentó inhibición parcial, más marcada en el precipitado total que en las fracciones. En este caso tanto la fracción IgM como la IgG presentaron alguna actividad inhibitoria, pero con todos ellos se consiguió sólo un retardado del crecimiento (Tabla II).

Cuando se sembraron las cepas CC, L y Tulahuén en medios bifásicos adicionados de inmunosuero anti-Tulahuén la acción inhibitoria fue semejante para las 3 cepas ensayadas.

## DISCUSION

La capacidad de inhibición de crecimiento o la producción de alteraciones morfológicas importantes en cultivos por acción de inmunosueros específicos ha sido descripta para diversos protozoarios. Así, NAKAMURA en 1958<sup>10</sup> comunicó inhibición parcial del crecimiento de *Entamoeba histolítica* por inmunosueros de conejo y humano. ADLER, en 1964<sup>2</sup> demostró aglutinación y cambios morfológicos con diversas especies de *Leishmanias* cuando eran cultivadas en presencia de inmunosueros homólogos; combinando esto con los resultados obtenidos con inmunosueros absorbidos logró un sistema adecuado para la caracterización de diversas especies y "variedades" de este género. WERTHEIN & col., en 1970<sup>19</sup>, comunicaron que el agregado de inmunosuero de conejos no interferiría con la mitosis normal de leptomonas de *Leishmania tropica* pero alteraría la membrana celular originando masas aglutinadas con aspecto sincicial de cuya periferia podrían emerger células normales después de algunos días de crecimiento.

En lo que respecta a *T. cruzi*, FISTEIN & TALUKDER<sup>4</sup> comunicaron reducción del crecimiento a la décima parte, con el agregado a los cultivos de suero de conejos con infección crónica. Según estos Autores los parásitos remanentes eran amastigotes. El suero inactivado a 56°C redujo el crecimiento del cultivo igual que el no inactivado, pero las formas remanentes estaban constituidas tanto por formas aflagelares como por epimastigotes y metacíclicos. Estos Autores suponen que existiría un factor termoestable, presente en el inmunosuero (anticuerpo probablemente), que sería el causante de la disminución del crecimiento, y otro termolábil, presente en sueros normales, necesario para que en el crecimiento remanente no se detecten formas flagelares.

ADLER en 1958<sup>1</sup> trabajó con diferentes diluciones de inmunosueros de conejos adicionados a cultivos y registró una actividad inhi-



bitoria del crecimiento que la atribuyó a la acción de anticuerpos, y una actividad que permitió una aparente mitosis normal de los parásitos sin posterior separación de los mismos, originando masas sinciciales; este Autor consideró que la formación de estas masas sinciciales estaría determinada por un anticuerpo diferente del inhibidor de crecimiento. No encontró relación entre los títulos de estas actividades entre sí, ni con respecto a la actividad serológica. Adler hizo un minucioso relato de las alteraciones morfológicas de los epimastigotes, producidas por los inmunosueros, y si bien las relacionó con la acción de anticuerpos no los caracterizó. Tampoco trabajó con sueros inactivados.

Los resultados registrados por nosotros durante la observación directa de los cultivos adicionados de inmunosueros de conejo fueron semejantes a los comunicados por Adler en los que se refiere a la actividad inhibitoria del crecimiento. El suero anti-T fue aparentemente el menos activo ya que permitió en reiteradas oportunidades un restablecimiento del cultivo a pesar de inhibir la multiplicación durante los primeros días. Esta menor actividad podría estar relacionada con una insuficiente inmunización o bien con una diferencia antigénica entre la forma tripomastigote y epimastigote con que se prepararon el suero anti-T, y los sueros anti-HT y anti-E, respectivamente. Sin embargo, cuando se probó la acción inhibitoria del suero anti-T de 15 días, se detectó una actividad inhibitoria prolongada relacionada con la IgM. Estos resultados parecerían indicar como más factible una menor acción del suero anti-T de 60 días por menor eficacia de la inmunización. El crecimiento tardío de algunos cultivos fue también observado por Adler y él supuso que podía estar relacionado con una cantidad insuficiente de anticuerpos<sup>1</sup>. De todas maneras quisimos verificar si esta población de parásitos, capaz de desarrollar tardíamente en un cultivo que posea un inmunosero, se trataba o no de una selección de población resistente a este inmunosero. Cuando los parásitos recuperados y lavados de este cultivo se sembraron en medio sin suero, crecieron normalmente como era de esperar. Pero cuando se resembraron en presencia de suero anti-HT y de suero anti-T, se comportaron como la población inicial: inhibición total en el primer caso y crecimen-

to tardío en el segundo. Estos resultados no indican la selección de una población resistente, sino que avalarían la posibilidad de comportamientos diferentes entre los inmunosueros como condición individual en relación directa a la concentración de los factores inhibidores del crecimiento, como ya fuera sugerido por ADLER<sup>1</sup>.

La inactivación de los sueros no alteró prácticamente su actividad sobre el cultivo. Esto difiere con resultados de experimentos realizados *in vitro* que indicarían que el suero de conejo actuaría lisando los parásitos por el mecanismo clásico de antígeno-anticuerpo con participación del complemento activado por la vía normal<sup>3</sup>. Como nuestros experimentos se realizaron en un medio de cultivo, quizás la actividad del complemento no se manifestó por no poseer este medio una adecuada concentración catiónica para que el mismo sea accionado. La actividad aglutinante, que generalmente precede a la lisis y que no necesita del sistema complemento, pudo haber sido suficiente para producir la inhibición del crecimiento con posterior destrucción de los parásitos. Esto quizás explicaría el hecho de que se necesiten 3 horas de contacto entre el antígeno y el inmunosero para que su acción sea irreversible. En este sentido, aunque es difícil establecer comparaciones con lo comunicado por FISTEIN & TALUKDER<sup>4</sup>, es probable que nuestros resultados no difieran realmente de los de ellos; en nuestro caso, los sueros anti-T de 60 días, producen una inhibición temporaria del crecimiento, aparentemente más importante con el suero no inactivado que con el inactivado. Si es que la inhibición con crecimiento tardío de los cultivos se produce por cantidad insuficiente de anticuerpos como lo sugiere ADLER<sup>1</sup>, sería probable que la integridad del sistema complemento contribuyera a potenciar la acción de los inmunosueros sobre los cultivos.

La absorción de la capacidad inhibitoria de crecimiento tanto por epimastigotes vivos, como con polvo total y material insoluble, indicarían que lo que se absorbe son anticuerpos relacionados con la superficie del parásito y esto podría correlacionarse con la absorción de anticuerpos aglutinantes que reaccionan precisamente con los antígenos de superficie. En este sentido, si bien Adler no detectó relación

entre el título de estos anticuerpos y la actividad inhibitoria de crecimiento, el título aglutinante de cada suero fue siempre superior a su actividad inhibitoria <sup>1</sup>.

La absorción con el material soluble fue evidentemente insuficiente y si bien no permitió una adecuada duplicación y separación de los parásitos, no inhibió realmente su crecimiento ya que permitió la formación de gigantes "rosetas". Esto quizás podría relacionarse con los supuestos anticuerpos que no interfieren en la mitosis de los parásitos pero si en el normal crecimiento de los cultivos propuesto por ADLER para *T. cruzi* <sup>1</sup> y por WERTHEIN & col. para *L. tropica* <sup>19</sup>.

El hecho de que la diálisis no modificase la actividad de los inmunosueros indica que el elemento activo es una macromolécula.

Finalmente, el poder relacionar la actividad inhibitoria con las globulinas en general, y con la IgG en el suero anti-HT, con la IgM en el anti-T de 15 días y tanto en IgM como en IgG en el anti-T de 60 días, nos permite postular que la acción inhibitoria del crecimiento de epimastigotes en cultivos evidenciada por inmunosueros de conejos es realmente producida por anticuerpos. Este anticuerpo sería formado en respuesta a antígenos no específicos de cepa ya que esta acción se determinó también con cepas heterólogas.

### SUMMARY

*Trypanosoma cruzi*: the action of specific rabbit immune sera on the growth of epimastigotes in diphasic media.

The behaviour of specific anti-*T. cruzi* immune sera produced in rabbits by inoculation of epimastigotes (anti-E), trypomastigotes (anti-T) or antigens from disrupted epimastigotes (anti-HT) upon culture forms of *T. cruzi* was studied. All of these immune sera agglutinate epimastigotes maintained in culture, altering their motility and morphology. Low concentrations of immune sera usually destroyed the parasites completely. A delay in growth was observed when antisera were incubated with the parasites for 60 minutes, however changes in cultures were irreversible after 3 hours of incubation. In some cases pa-

rasites incubated with anti-T immune sera showed late reproduction. Absorption of sera with epimastigotes, epimastigote powder or the insoluble fraction of epimastigote powder prevented the deleterious effect of immune sera upon epimastigotes. On the other hand, absorption with the soluble fraction, as well as previous dialysis of the immune sera were ineffective to prevent the activity of the sera upon cultures. This activity was strain independent, but was well correlated with the presence of IgM or IgG respectively, when the immune sera were obtained from animals in the acute or chronic stages of infection.

### AGRADECIMIENTO

Los Autores agradecen al Dr. Simón Lajmanovich su constante crítica y orientación durante la ejecución de este trabajo.

### REFERENCIAS

1. ADLER, S. — The action of specific serum on a strain of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 52:282-301, 1958.
2. ADLER, S. — Leishmania. En *Advances in Parasitology* 2:35-96, 1964. Dawes, B. Ed. New York, Academic Press.
3. ANZIANO, D. F.; DALMASSO, A. P.; LELCHUK, R. & VAZQUEZ, C. — Role of complement in immune lysis of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 6:860-864, 1972.
4. FISTEIN, B. & TALUKDER, M. A. S. — Growth rate of *Schizotrypanum cruzi*; effect of serum from infected animals. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 64:166-167, 1970.
5. FLODIN, P. & KILLANDER, G. — Fractionation of human serum proteins by gel filtration. *Biochem. Biophys. Acta* 63:403-410, 1962.
6. GONZÁLEZ CAPPA, S. M.; SCHMUNIS, G. A.; TRAVERSA, O. C.; YANOVSKY, J. F. & PARODI, A. S. — Complement fixation test, skin test and experimental immunization with antigens of *T. cruzi* prepared under pressure. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 17:709-715, 1968.
7. GONZÁLEZ CAPPA, S. M. & KAGAN, I. G. — Agar gel and immunoelectrophoretic analysis of several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasit.* 25:50-57, 1969.
8. LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, N. H.; LEWIS-FARR, A. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.

9. MUNIZ, J. & BORRIELLO, A. — Estudio sobre acción lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguícolas do *Schizotrypanum cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 5:563-576, 1945.
10. NAKAMURA, M. — Inhibition of *Entamoeba histolytica* in vitro by specific antibody. *Bact. Proc.* pag. 104-107, 1958.
11. NOGUCHI, H. 1924 — Citado por PIFANO, C. F. & SCORZA, J. V. — Aspectos inmunológicos de las Leishmanias que parasitan al hombre con especial referencia a la *Leishmania brasiliensis pifanoi*, Meicina & Romero, 1957. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit.* 3:15-30, 1960.
12. PIZZI, T.; RUBIO, M. & KNIERIM, F. — Immunology of Chagas'disease. *Rev. Parasit.* 15: 577-592, 1954.
13. RUBIO, M. — Actividad lítica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguíneas de *T. cruzi*. *Bol. Chil. Parasit.* 11:62-69, 1956.
14. SCHMUNIS, G. A. & HERMAN, R. — Characteristics of so-called natural antibodies in various normal sera against culture forms of *Leishmania*. *J. Parasit.* 56:889-896, 1970.
15. TALIAFERRO, W. H. & PIZZI, T. — Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 96:199-226, 1955.
16. VATTUONE, N. H. & YANOVSKY, J. F. — *Trypanosoma cruzi*: Agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. *Exp. Parasit.* 30:349-355, 1971.
17. WARREN, L. G. — Biochemical studies on chicken macrophages infected in vitro with *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasit.* 7:82-91, 1958.
18. WARREN, L. G. & BORSOS, T. — Studies on immune factors occurring in sera of chickens against the crithidia stage of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immun.* 82:585-590, 1959.
19. WERTHEIN, G.; RONAR, A. & MONTILIO, B. — Changes in leptomonads of *Leishmania tropica* grown in media containing immune serum. *Nature (London)* 226:267-269, 1970.
20. WILLIAMS, C. A. & CHASE, M. W. — *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Vol. 1, pag. 319, 1967. Ed. Academic Press, New York.
21. YANOVSKY, J. F.; GONZALEZ CAPPA, S. M.; GARAVELLI, H. J.; TRAVERSA, O. C. & SCHMUNIS, G. A. — Nueva reacción para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 41:166-172, 1965.

Recebido para publicação em 2/6/1976.