

INFECCIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN RATONES DESPUES DE SU TRATAMIENTO CON *TRYPANOSOMA LEWISI*

Walterio GARCÍA (1) y Heinz MÜHLPFORDT (2)

RESUMÉN

Debido a la semejanza metabólica del *T. lewisi* con el *T. cruzi*, se usó el primero para inmunizar ratones contra una infección del último. Solamente al tratarlos varias veces con parásitos vivos de cultivo dio cierta protección. Se encontró una parasitemia muy baja y ninguna muerte en los animales tratados, en comparación con la alta parasitemia y 60% de muertes en los animales no tratados. Las reacciones serológicas efectuadas, indican la presencia de uno o más posibles antígenos comunes.

INTRODUCCIÓN

En el ratón, animal apropiado para la infección experimental con *T. cruzi*, el curso de la infección es muy variable, influyendo en esta la virulencia de las cepas, el número de parásitos, la vía de inoculación, la edad de los animales y la alimentación^{4, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 32, 33, 35}. Se pueden señalar también otros factores que intervienen en el desarrollo del *T. cruzi* en el animal de experimentación; entre otros, se ha buscado la influencia de la cortisona^{1, 3, 6, 7, 25} y de la temperatura^{2, 34} para obtener una explicación sobre su posible relación en la infección del hombre. Tienen un gran significado los trabajos de inmunización con trypanosomas muertos, cepas atenuadas, avirulentas y toxinas^{9, 10, 15, 20, 21, 22, 26, 27, 29, 30}. Pero a pesar de lo interesante y alentador de estos resultados, presentan hasta el momento poco valor práctico en la lucha contra la enfermedad de Chagas, ya que se desconoce el comportamiento de estas cepas en el hombre, pudiéndose presentar una elevación o aumento

de la virulencia con resultados adversos; por estas razones no se han aplicado al hombre dichas cepas. Buscando otras posibilidades para encontrar una protección contra una infección con *T. cruzi* posterior, usamos *T. lewisi*, cepa no patógena para el hombre, ya que esta cepa tiene con el *T. cruzi* ciertas semejanzas metabólicas, resumidas recientemente por DANFORTH⁵.

La especie de *T. lewisi* está bien adaptada en ratas, pudiéndose mantener en ratones solamente cuando se les trata diariamente con suero de rata^{14, 23}. La duración de la infección intra-peritoneal en ratones no tratados, depende de la dosis infectante, encontrándose muy escasos parásitos cuatro días después de la infección como tiempo máximo, pudiendo considerarse a estos como sobrevivientes del inóculo. Tiene como objeto el presente trabajo informar el curso de la infección de *T. cruzi* en ratones previamente tratados varias veces con formas de cultivo vivas de *T. lewisi*.

Este trabajo fué realizado con ayuda financiera de la Deutsche Forschungsgemeinschaft

(1) Becario del Deutscher Akademischer Austauschdienst y de la Universidad Nacional Autónoma de México

(2) Docente del Departamento de Protozoología (Director: Prof. Dr. A. Westphal), Instituto de Medicina Tropical de Hamburgo (Director: Prof. Dr. H. H. Schumacher), Germany

MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa de *T. cruzi* usada fue aislada de triatomas infectados provenientes del Perú (cepa "P"). Es más virulenta que la brasileña "Y" aislada por SILVA & NUSSENZWEIG³², en 1953. La cepa "P" tiene la particularidad de presentar parasitemia más elevada que la "Y", matando ratones con un peso aproximado de 15 g. La de *T. lewisi* se recibió de Inglaterra*, fue aislada por Fulton y cultivada "in vitro", sin que hasta la fecha hayamos podido infectar con ellas los huéspedes naturales, o sean las ratas. Para el tratamiento de los animales se usaron cultivos en masa de 19 días, descritos por NAKAMURA²⁴ y modificados para *T. lewisi*.

Treinta ratones NMRI (Hannover) SPF, tuvieron un peso inicial de 18 g como promedio y de 28 g cuarenta días después al ser infectados con *T. cruzi*. Los animales fueron separados en cajas con cinco cada una y mantenidos a temperatura ambiente. Recibieron alimento LATZ normal; agua y comida la tuvieron "ad libitum". Se dividieron para el trabajo en dos grupos de 15 ratones cada uno (grupo A y grupo B).

El grupo A fue tratado 8 veces (cada 5 días) con un total de $2,7 \times 10^7$ parásitos. Las vías de administración fueron las siguientes: pulpejos de las patas (dos veces), intramuscular (dos veces) y el resto intraperitoneal. El grupo B fue tratado en igual forma, con la misma cantidad del medio (fase líquida) ausente por completo de parásitos. Cinco días después de terminar el tratamiento, se sacrificaron cinco animales de cada grupo (A₁ y B₁) para determinar anticuerpos por los métodos de hemaglutinación indirecta³¹ y doble difusión en agar²⁸, el resto fue infectado con $1,6 \times 10^6$ *T. cruzi* intraperitoneal. El peso y la parasitemia fueron controlados los días hábiles durante las tres primeras semanas, después cada tercer día. Las cuentas de parásitos se efectuaron en 25 campos con un aumento de objetivo $40 \times$ ocular 8.

RESULTADOS

La parasitemia se encuentra resumida en la Tabla I.

En el grupo A, esta fue ocasional y muy baja. La evolución de la infección fue variable, encontrándose en unos ratones de corta duración (ratones 1, 3, 4, 6), en otros mas larga (ratones 7, 9, 10). Probablemente en estos últimos la parasitemia fue constante en muy escasa cantidad, no siendo posible demostrarla con los métodos utilizados. Esta parasitemia tan baja no ocasionó ninguna muerte en estos animales tratados con *T. lewisi*. El peso de los ratones durante la infección mostró variaciones; se conservó más o menos igual en unos (ratones 1, 3, 7), aumentando en otros (ratones 2, 4, 6, 8, 9, 10) y disminuyó en uno (ratón 5). No fue posible correlacionar el peso con la duración de la parasitemia.

En el grupo B la parasitemia fue muy elevada en seis animales (ratones 3, 4, 6, 8, 9, 10), en uno de mediana intensidad (ratón 7) y en tres de baja (ratones 1, 2, 5). Se encontró constante hasta su muerte o hasta el fin de las observaciones; solamente el ratón No. 1 fue negativo en las dos últimas. De este grupo murieron seis, de los cuales cinco se encontraban con elevada parasitemia (ratones 3, 4, 6, 8, 9) y uno con escasa (ratón 1). Al igual que en el grupo anterior, no se encontró relación alguna entre peso y parasitemia.

Los resultados de las reacciones serológicas se encuentran resumidos en el Cuadro I. La formación de anticuerpos, al igual que la parasitemia, varía en los animales. En el grupo A₁ se encontraron tres animales con diversos títulos contra *T. lewisi* (ratones 1, 4, 5), dos de ellos con títulos muy bajos contra *T. cruzi* (ratones 1, 5). Cuatro dieron bandas de precipitación contra antígenos de *T. lewisi* en la doble difusión en agar (ratones 1, 3, 4, 5), dos de ellos doble banda (ratones 3, 5). Contra antígenos de *T. cruzi*, solo dos dieron una banda (ratones 1, 5).

Del grupo B₁ en hemaglutinación, solo uno (ratón 2) dio un título bajo contra *T. lewisi* y ninguno contra *T. cruzi*. La doble difusión en agar no mostró ninguna banda de precipitación para antígenos de *T. lewisi* y *T. cruzi*.

*. Agradecemos al Dr. Ryley el envío de la cepa.

TABLA I

Parasitemia en los animales tratados con *T. lewisi* (Grupo A)
y de los controles (Grupo B)

Días despues infecc.	GRUPO A									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	(+)	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
14	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	-
15	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-	(+)	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)
21	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
22	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
42	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-

Días despues infecc.	GRUPO B (CONTROLES)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
3	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
9	(+)	(+)	(+)	-	-	+	(+)	(+)	++	(+)
10	+	+	+	+	(+)	+++	+	+	++	+
11	(+)	+	(+)	+	(+)	++++	+	+	+++	+
14	(+)	+	+	++++	+	+++++	++	++	+	++
15	(+)	(+)	++	++	+	+++++	+	+++	+	++++
16	(+)	(+)	+	++	(+)	+	+	+++	+	++++
17	(+)	(+)	+	++++	(+)	+	+	+	+	++
18	(+)	(+)	+++	++++	(+)	+	+	++	+	++
21	(+)	+	+++	+++++	+	+	+	+++	+	++
22	+	+	+++++	+++++	+	+	+	+++	+	++
25	(+)	(+)	+	+	(+)	+	+	++	+	++
28	(+)	(+)	-	-	(+)	+	+	+++	+	++
30	(+)	(+)	-	-	(+)	+	+	+++++	+	(+)
32	(+)	+	-	-	(+)	+	+	+++	+	(+)
33	(+)	+	-	-	(+)	+	+	+++	+	(+)
35	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	+	+++	+	(+)
37	(+)	-	-	-	-	-	-	++	+	(+)
40	+	-	-	-	(+)	+	+	++	+	-
42	-	(+)	-	-	(+)	+	+	+	+	-

- = Negativo
 (+) = Menos de 1 parásito por campo
 + = 1-5 parásitos por campo
 ++ = 6-10 parásitos por campo
 +++ = 11-20 parásitos por campo
 ++++ = Mas de 20 parásitos por campo.

CUADRO I

Resultados de las reacciones de hemaglutinación y doble difusión en agar. Grupo A₁ tratado solamente con *T. lewisi*, grupo B₁ controles no tratados

Ratón No.	Hemaglutinación		Doble difusión en agar <i>Trypanosoma lewisi</i>			Doble difusión en agar <i>Trypanosoma cruzi</i>		
	<i>T. lewisi</i>	<i>T. cruzi</i>	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.
A ₁ 1	160	10	(((—	((
A ₁ 2	—	—	—	—	—	—	—	—
A ₁ 3	—	—	((((((—	—	—
A ₁ 4	10	—	—	((—	—	—
A ₁ 5	20	10	(((((((((
C O N T R O L E S								
B ₁ 1	—	—	—	—	—	—	—	—
B ₁ 2	20	—	—	—	—	—	—	—
B ₁ 3	—	—	—	—	—	—	—	—
B ₁ 4	—	—	—	—	—	—	—	—
B ₁ 5	—	—	—	—	—	—	—	—

DISCUSIÓN

Los intentos por encontrar una protección contra la infección experimental de *T. cruzi* han sido, hasta la fecha, usando parásitos homólogos y sus toxinas^{9, 10, 15, 20, 21, 22, 26, 27, 29, 30}.

En este trabajo se demuestra por vez primera una protección contra la infección experimental de *T. cruzi* con una especie de *Trypanosoma* heteróloga, cuyo metabolismo es semejante al de *T. cruzi*⁵, con resultados semejantes a los descritos por los Autores antes mencionados. Al igual que en los trabajos realizados hasta ahora, no hubo una protección total, encontrándose muy disminuída la parasitemia.

Conocido es por nosotros un trabajo⁸ en el que se trató de encontrar una protección contra *T. cruzi* experimental, usando ratas que fueron infectadas con formas sanguíneas de *T. lewisi*. Consideramos que la rata no es un animal tan apropiado como el ratón para la infección experimental de *T. cruzi*, ya que tiene una mayor resistencia que el ratón¹¹. Según nuestras experiencias anteriores, no es suficiente una sola inoculación o el tratamiento con suero de rata inmune contra *T. lewisi* para proteger al ratón de una posterior infección con *T. cruzi*.

Los títulos bajos encontrados en la hemaglutinación son por sí solos de poco valor, pero junto con la evolución de la parasite-

mia, son muy significativos, no pudiéndose encontrar una explicación en la discordancia entre hemaglutinación y difusión en agar en un caso (ratón A₁ 3) ya que se supone que la primera es más sensible para detectar anticuerpos.

En la presencia de anticuerpos se encontró dos veces (ratones 1, 5) una relación entre hemaglutinación y doble difusión en agar con antígeno de *T. cruzi*, hallazgo de gran significado si se toma en cuenta que estos animales no tuvieron ningún contacto, ni fueron infectados antes con *T. cruzi*, lo que indica la existencia de un posible antígeno común entre ambas especies.

Al igual que los trabajos experimentales antes realizados, en los que se desconoce el comportamiento de cepas de *Trypanosoma cruzi* atenuadas en el hombre, el presente trabajo no tiene por el momento un valor práctico, pero lo tendrá cuando se aislen el o los antígenos comunes entre *Trypanosoma lewisi* y *Trypanosoma cruzi*.

SUMMARY

Trypanosoma cruzi infection of mice, following their sensitization with *Trypanosoma lewisi*

Due to the metabolic similarity between *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma cruzi*, the first was used to sensitize mice against the latter. A very low parasitaemia was found and not one of the animals died. In untreated animals a very high parasitaemia was found and 60% of these animals died. The serological reactions observed indicate the presence of one or possibly more common antigens.

REFERENCIAS

1. AGOSIN, M. — Cortisona y enfermedad de Chagas experimental. *Rev. Med. (Chile)* 80:34-37, 1952.
2. AMREIN, Y. U. — Effects of environmental temperature on *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Parasit.* 53:1160, 1967.
3. BRAND, T. V.; TOBIE, E. J. & MEHLMAN, B. — The failure of cortisone, ACTH to influence glucogenesis during Trypanosomiasis of the fasting rat. *Amer. J. Hyg.* 54:76-81, 1951.

4. CULBERTSON, J. T. & KESSLER, W. R. — Age resistance of mice to *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasit.* 28:155-158, 1942.
5. DANFORTH, W. F. — Respiratory metabolism. Pergamon Press Oxford. Edit., CHEN, T. — *Res. Protozoology* 1:201-306, 1967.
6. GALLIARD, H.; LAPIERRE, J. & COSTE, M. — Protection croisée entre souches hétérologues de *Trypanosoma cruzi* chez la souris. Son inhibition par la cortisone. *C. R. Soc. Biol.* 154:1267-1270, 1962.
7. GALLIARD, H.; LAPIERRE, J. & COSTE, M. — Contribution à l'étude d'une souche pathogène de *Trypanosoma cruzi* (Souche Tulahuén, Chili). *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 37:495-503, 1962.
8. KAGAN, I. G. & NORMAN, L. — Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. I — Susceptibility of CFW stock mice for the "Tulahuén" strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 107:165-167, 1960.
9. KAGAN, I. G. & NORMAN, L. — Immunological studies on *Trypanosoma cruzi*. III — Duration of acquired immunity in mice initially infected with a northamerican strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 108:213-217, 1961.
10. 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.
11. KOLODNY, M. H. — Studies on age resistance against trypanosome infections. I — The resistance of rats of different ages to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Amer. J. Hyg.* 29:13-24, 1939.
12. KRAMPITZ, H. & DISKO, R. — Retardation of parasitaemia, prolongation of life or survival of lactating mice in infections with *Trypanosoma cruzi*. *Nature (London)* 209:526, 1966.
13. LEHMANN, D. L. — Some dehydrogenases from five species of southamerican trypanosoma and leishmania. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 59:494-495, 1965.
14. LINCICOME, D. R. — Serial passage of *Trypanosoma lewisi* in the heterologous mouse host. I — Developmental history during the transfer in calorically restricted hosts. *J. Protozool.* 6:310-315, 1959.
15. 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.

16. MARDSEN, P. D. — *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. I — Mortality with different doses of trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 61:57-61, 1967.
17. MARDSEN, P. D. — *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. II — Infections induced by different routes. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 61:62-67, 1967.
18. MAZZOTTI, L. — Variations in virulence for mice and guinea pigs in strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas from different species of bugs (Triatomidae) from different localities in Mexico. *Amer. J. Hyg.* 31:67-85, 1940.
19. MAZZOTTI, L. — Effects of inoculating small and large numbers of *Trypanosoma cruzi* into mice. *Amer. J. Hyg.* 31:86-91, 1940.
20. MENEZES, H. — Use of adjuvants in the vaccination of mice with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Brasil. Med.* 22:536-538, 1965.
21. MENEZES, H. — The use of adjuvante in the vaccination of mice with lyophilized "*Trypanosoma cruzi*". *Hospital (Rio)* 68: 1341-1346, 1965.
22. 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.
23. MÜHLPFORDT, H. — Untersuchungen über die experimentelle *Trypanosoma lewisi*-Infektion der Maus. *Z. Tropenmed. Parasit.* 19:73-82, 1968.
24. NAKAMURA, M. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in a protein free dialysate medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125: 779-780, 1967.
25. NEGhme, A.; BADÍNEZ, O.; JARPA, A.; THIERMANN, E.; AGOSIN, M. & CHRISTIAN, R. — Acción de la cortisona sobre la trypanosomiasis chagásica experimental del ratón suprarrenoprivo y total. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 7:4-6, 1952.
26. 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.
27. 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.
28. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 26:507-515, 1949.
29. 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.
30. SENECA, H. — Active immunization of mice with Chagas-toxin. *Nature (London)* 209:309-310, 1966.
31. SEVER, J. L. — Application of a micro-technique to visual serological investigations. *J. Immun.* 8:320, 1962.
32. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20:191-208, 1953.
33. WATKINS, R. — Comparison of infections produced by two strains in a *Trypanosoma cruzi* mice. *J. Parasit.* 52:953-961, 1966.
34. WOOD, S. F. — Environmental temperature as a factor in development of *T. cruzi* in *Triatoma protracta*. *Exp. Parasit.* 3:227-233, 1954.
35. YAEGER, R. G. & MILLER, O. N. — Effect of malnutrition on susceptibility of rats to *Trypanosoma cruzi*. I — Thiamine deficiency. *Exp. Parasit.* 9:215-222, 1960.

Recebido para publicação em 6/8/1968.