

ESTUDIOS SOBRE LA TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD HUMORAL CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI INDUCIDA POR CALOR EN RATONES

Felipe GUHL (1), Cornelis J. MARINKELLE (2), Nhora de SANCHEZ (1) y Max GRÖGL (1)

RESUMEN

Ratones CFW fueron inoculados con una dosis mortal de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén) y mantenidos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Los sueros de estos ratones fueron colectados en diferentes días y examinados para detectar anticuerpos mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los sueros fueron también inoculados a ratones infectados con *T. cruzi*, pero mantenidos a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Estos ratones a su vez fueron sangrados a diferentes tiempos, observándose un aumento considerable en el título de anticuerpos chagásicos en comparación con los niveles de anticuerpos de los ratones mantenidos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Además, los ratones inoculados con suero hiperinmune y mantenidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, mostraron un alto grado de protección contra la infección, medido por el tiempo de supervivencia. Se demuestra que ratones infectados con *T. cruzi* y mantenidos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ producen alguna sustancia, que al inocularla en ratones infectados y mantenidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, es capaz de inducir protección contra una dosis letal del parásito. Por lo tanto, parece que la protección no se puede explicar simplemente por el efecto directo de la alta temperatura sobre el tripanosoma.

INTRODUCCION

Varios Autores han realizado trabajos experimentales alterando la temperatura de experimentación, para estudiar el curso de la enfermedad de Chagas y la multiplicación de *Trypanosoma cruzi* y otros tripanosomas en ratas, ratones, cultivo de tejido y triatomíneos ^{2,6, 8,10,11,14,15,16,17,18,20,21}.

Aunque algunos Autores ^{2,16} han demostrado que altas temperaturas del medio ambiente prolongan la supervivencia de los ratones inoculados con una dosis letal de *T. cruzi*, el mecanismo de protección no ha sido todavía esclarecido ¹⁹. A pesar de que los anticuerpos probablemente deben estar involucrados, la posible influencia directa de la alta temperatura de mantenimiento faltaba por ser investigada. El objetivo del presente trabajo es demostrar que alguna sustancia es producida en el ratón infectado con *T. cruzi* cuando se le mantiene a

alta temperatura, la cual, al transferirla a ratones infectados y mantenidos a temperaturas más bajas es capaz de producir protección contra la dosis letal de *T. cruzi*, excluyendo así el posible efecto directo del calor.

MATERIALES Y METODOS

En todos los experimentos se utilizó la virulenta cepa Tulahuén de *T. cruzi* y ratones CFW machos de 17-22 g de peso. En un experimento preliminar se inocularon 320 ratones, mantenidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con diferentes cantidades de formas sanguíneas de *T. cruzi* y se observó el tiempo de supervivencia (Tabla I). Los ratones fueron mantenidos en jaulas metálicas de 27 x 19 x 12 cm en número de tres por jaula, con agua, zanahoria y comida concentrada *ad lib*.

(1) Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Universidad de los Andes, Apartado Aéreo 4976, Bogotá, Colombia

(2) Universidad de Cartagena, Apartado Aéreo 1313, Cartagena, Colombia

En los demás experimentos se escogió un inóculo de 250.000 tripomastigotes sanguíneos, obtenidos a los nueve días después de inocular ratones mantenidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los grupos experimentales que se denominaron A y B fueron inoculados con *T. cruzi* y mantenidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ respectivamente. Asimismo se establecieron grupos controles A y B conformados por valores mantenidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ respectivamente.

Todos los ratones fueron sangrados al noveno días después de iniciado el experimento. Se hizo una mezcla de sueros de cada grupo, que se utilizó para inocular 0,2 ml de suero a otros ratones ya infectados, durante nueve días consecutivos y conformar así los grupos W, X, Y y Z (Tabla II). Grupo W: Inoculados con *T. cruzi* e inoculados con suero de ratones del grupo A; Grupo X: Inoculados con *T. cruzi* y suero de ratones del grupo Control A; Grupo Y: Inoculados con *T. cruzi* y suero de ratones del grupo B; Grupo Z: Inoculados con *T. cruzi* y suero de ratones del grupo Control B. Los úl-

timos cuatro grupos fueron mantenidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Sueros de tres ratones de cada grupo fueron titulados para detectar la presencia de gammaglobulinas totales en distintos días de infección (Tabla III) mediante la prueba de IFI para *T. cruzi*, según la técnica de CAMARGO⁵ utilizando conjugado Nordic (*). Los grupos A, W, X y Z solamente se sangraron el día noveno, ya que dichos animales no sobreviven más de 14 días (Tabla IV).

Se utilizó como suero control positivo el suero de ratones del grupo B sangrados 20 días después de la infección. El control negativo fue suero de ratones del grupo Control A.

En cada grupo se observó el período de supervivencia de 10 animales.

RESULTADOS

El promedio de supervivencia de ratones inoculados con distintas dosis de *T. cruzi* se presenta en la Tabla I.

T A B L A I

Datos de supervivencia hallados en 320 ratones C.F.W. inoculados con diferentes cantidades de *Trypanosoma cruzi*

Número de formas por inóculo	Número ratones inoculados	Promedio de supervivencia en días	Ratones muertos(*)
$5 \times 10^3 \pm 1.000$	40	13,6	
$30 \times 10^3 \pm 6.000$	40	13,2	2
$80 \times 10^3 \pm 16.000$	40	12,9	1
$160 \times 10^3 \pm 16.000$	40	12,5	1
$250 \times 10^3 \pm 50.000$	40	12,4	2
$350 \times 10^3 \pm 70.000$	40	11,7	1
$450 \times 10^3 \pm 90.000$	40	11,2	
(**) —	40	718	

(*) Se refiere a los ratones que murieron dentro de los primeros 10 días después de inoculados.

(**) Grupo Control no inoculado.

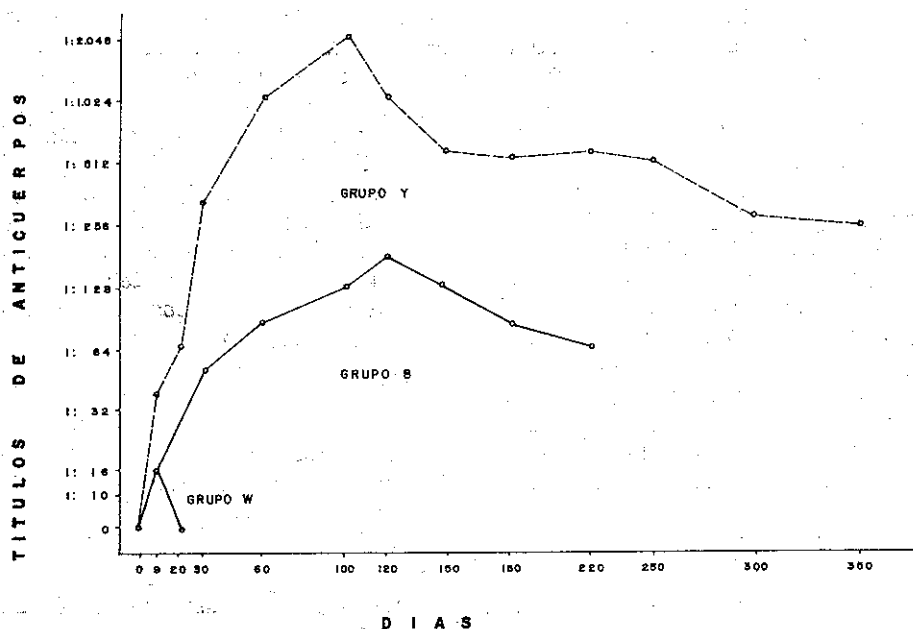
Los niveles de anticuerpos en los sueros de los ratones pertenecientes a los diferentes grupos, después de distintos tiempos de infección y de sangría titulados mediante IFI se presentan en la Tabla III. Los niveles de anticuerpos en los grupos Y y B se distribuyen normalmente de acuerdo a los períodos Mazza-Jörg (Gráfica I). Comparando el curso de las infecciones puede notarse que los ratones de los grupos W, X y Z sufrieron una enfermedad aguda y fatal, sin excepción todos murieron antes del día 14. Los ratones del grupo B sobrevivieron un período de tiempo bastante largo, pero ninguno más de 232 días, mientras que los ratones del

grupo Y se sobrepusieron completamente a la infección, sobreviviendo más de 350 días.

Puede notarse que el título promedio más alto alcanzado por los animales del grupo B fue de 1:170 mientras que el grupo Y fue de 1:2048, es decir, cuatro veces mayor (Tabla IV) y 7 veces mayor al título promedio de los sueros pertenecientes al grupo A. Además, los niveles de anticuerpos permanecieron elevados durante un período de tiempo mucho mayor en los animales del grupo Y que los del grupo B (Tabla IV).

(*) Nordic Pharmaceuticals and Diagnostics

GRAFICA I
DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA HUMORAL
ENTRE LOS GRUPOS Y, B y W



T A B L A I I

Metodos de mantenimiento y experimentación utilizados en los grupos de ratones C.F.W. en estudio

Grupo	Número de ratones	Temperatura de mantenimiento	No. formas de <i>T. cruzi</i> (*)	Tipo de suero inoculado	Cantidad de suero inoculado	Días de sangría(**)
A	40	25 ± 2°C	2,5 x 10 ⁵			9
Control A	40	25 ± 2°C				9, 20, 30, 60, 100, 120, 150, 180, 220, 250, 300 y 350
B	50	36 ± 1°C	2,5 x 10 ⁵			9, 20, 30, 60, 100, 120, 150, 180, 220
Control B	40	36 ± 1°C				9, 20, 30, 60, 100, 120, 150, 180, 220, 250, 300 y 350
W	3	25 ± 2°C	2,5 x 10 ⁵	Grupo A	9 x 0,2 ml	9
X	3	25 ± 2°C	2,5 x 10 ⁵	Grupo B	9 x 0,2 ml	9
Y	3	25 ± 2°C	2,5 x 10 ⁵	Control A	9 x 0,2 ml	9
Z	3	25 ± 2°C	2,5 x 10 ⁵	Grupo B	9 x 0,2 ml	9, 20, 30, 60, 100, 120, 150, 180, 220, 250, 300 y 350
				Control B	9 x 0,2 ml	9

(*) Número de formas de *Trypanosoma cruzi* por inoculum.

(**) En cada uno de los días de sangría establecidos se analizaron los sueros mediante el método de inmunofluorescencia indirecta.

En la Tabla IV aparecen los títulos promedios de anticuerpos chagásicos; en la Gráfica I la diferencia en la respuesta humoral entre los diferentes grupos.

T A B L A I I I

Títulos de anticuerpos chagásicos encontrados mediante inmunofluorescencia indirecta en 3 ratones de cada grupo en los días indicados

Grupo	Número de días después de la infección											
	9	20	30	60	100	120	150	180	220	250	300	350
A	<1:16 <1:16 <1:16											
Control	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
A	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	1:16	1:16	1:32	1:64	1:128	1:128	1:128	1:64	1:64			
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:128	1:128	1:64	1:64				
B	1:16	1:32	1:64	1:128	1:128	1:256	1:128	1:128	1:64			
Control	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
B	1:16											
	1:16											
W	1:16											
	Neg.											
X	Neg.											
	Neg.											
Y	1:32	1:64	1:512	1:2048	1:2048	1:2048	1:1024	1:512	1:1024	1:512	1:512	1:256
	1:64	1:64	1:128	1:1024	1:2048	1:1024	1:512	1:512	1:512	1:512	1:256	1:256
Z	1:32	1:64	1:512	1:2048	1:2048	1:1024	1:512	1:512	1:512	1:512	1:256	1:256
	Neg.											
	Neg.											
	Neg.											

T A B L A I V

Títulos promedio de anticuerpos chagásicos obtenidos mediante inmunofluorescencia indirecta correspondientes a 3 ratones de cada grupo en los días indicados

Grupo	Número de días después de la infección											
	9	20	30	60	100	120	150	180	220	250	300	350
A	<1:16											
Control												
A	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
B	1:16	1:27	1:53	1:107	1:128	1:170	1:128	1:107	1:64			
Control												
B	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
W	1:16											
X	Neg.											
Y	1:42	1:64	1:383	1:1365	1:2048	1:1365	1:683	1:512	1:683	1:512	1:342	1:256
Z	Neg.											

DISCUSION

Es conocido que la cepa Tulahuén produce alta parasitemia y 100% de mortalidad en ratones CFW dentro de los primeros 16 días después de haber sido inoculados^{13,15}. Para confirmar el tiempo de supervivencia en las con-

diciones experimentales de nuestro laboratorio fue necesario realizar un estudio de los ratones inoculados con diferentes cantidades de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos (Tabla I), confirman las observaciones de KAGAN & NORMAN¹³.

Se utilizaron ratones machos de 17-22 g de peso, debido a que varios autores han encontrado que ellos presentan mayor susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* 3,4,7,9,12.

ADOLPH¹ demostró que una temperatura ambiental de 37,2°C era completamente tolerable para ratones. En nuestra experiencia los ratones del grupo B sufrieron un "stress" por el calor, en cual posiblemente influye sobre el sistema inmunológico dando como resultado un aumento en la producción de anticuerpos. Al pasar estos anticuerpos producidos en el grupo B a ratones mantenidos a 25 ± 2°C (grupo Y) se logró proteger a estos ratones contra los efectos de *T. cruzi*. OTIENO¹⁸ trabajando con *T. brucei*, sugirió que la reducción de la patogenicidad de los tripanosomas era debido al efecto directo de la alta temperatura sobre los parásitos. Como en nuestros experimentos se logró pasar un factor "protector" de los ratones mantenidos a una alta temperatura a los ratones mantenidos a temperatura más baja, queda demostrado que existe una sustancia protectora en el suero. Por lo tanto la protección no es explicable únicamente por el efecto directo de la alta temperatura sobre los tripanosomas.

Además, varios Autores han estudiado los efectos de la temperatura ambiental sobre *T. cruzi* y *T. brucei* y encontraron que temperaturas de 37 a 38°C no eran letales para el parásito en cultivo de tejidos^{6,10,21}. También es conocido que la fiebre en la enfermedad de Chagas aguda, no elimina al parásito⁸.

Observando el tiempo promedio de supervivencia de los grupos Y y B, y relacionándolos con los niveles de anticuerpos desarrollados a lo largo de la infección (Tabla III), puede notarse que a medida que aumenta la cantidad de anticuerpos fluorescentes, aumenta el período de supervivencia de los ratones.

De acuerdo con estas observaciones se podría pensar que dicho aumento de anticuerpos es el factor que protege activamente los animales contra la infección.

SUMMARY

Studies on the transfer of heat induced humoral immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice

A lethal dose of *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain) was inoculated into CFW mice maintained at 36 ± 1°C. Sera of these mice

were collected on different days and examined by the indirect immunofluorescent test. These sera were also inoculated into other mice infected with the same number of *T. cruzi*, but maintained at 25 ± 2°C. The latter mice were bled at different time intervals, and a considerable increase of antichagasic antibodies was observed in comparison with the antibody levels of mice maintained at 36 ± 1°C. Moreover, the mice inoculated with hyperimmune serum and maintained at 25 ± 2°C demonstrated a high grade of protection against the infection, measured by their survival time.

It was demonstrated that a substance is produced by *T. cruzi* infected mice maintained at 36 ± 1°C. When inoculated into *T. cruzi* infected mice maintained at 25 ± 2°C, this substance is capable to produce protection against the lethal dose of *T. cruzi*. Therefore, it seems that protection can not be explained by the plain direct effect of high temperature on the parasite.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores agradecen al Dr. Eladio Rodríguez por leer el manuscrito y por sus valiosos comentarios.

BIBLIOGRAFIA

- ADOLPH, E. F. — Tolerance to heart and dehydration in several species of mammals. *Amer. J. Physiol.* 151: 564-571, 1947.
- AMREIN, Y. U. — Effects of environmental temperature on *T. cruzi* infection in mice. *J. Parasit.* 53: 1160, 1967.
- BICE, D. E. & ZELEDON, R. — Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). *J. Parasit.* 56: 663-670, 1970.
- BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. (Tese). Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade de Minas Gerais. Belo Horizonte, (Mimio-grafiada), 1961.
- CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing pressured culture forms of *T. cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8: 227-234, 1966.
- CHALONER, L. A. — Multiplication of blood stream forms of *Trypanosoma brucei* in vitro at 37°C in the presence of mouse blood. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66: 527, 1972.

7. CULBERTSON, J. T. & KESSLER, W. R. — Age resistance of mice to *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasit.* 28: 155-158, 1942.
8. DALMA, J. — Primeros ensayos de piretoterapia en la enfermedad de Chagas. *Rev. Med. Norte. (Tucumán)* 3: 287-193, 1956.
9. DIAS, E. — Estudios sobre o *Schyzotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 28: 1-110, 1934.
10. DVORAK, J. A. & POORE, C. M. — *Trypanosoma cruzi*: Interaction with vertebrate cells in vitro. IV. Environmental temperature effects. *Exp. Parasit.* 36: 150-157, 1973.
11. FRANCA, R. M. E. & MACKINNON, J. E. — Efecto de la temperatura ambiental sobre la infección por *Trypanosoma cruzi*. *An. Fac. Med. (Montevideo)* 47: 310-313, 1962.
12. HAUSCHKA, T. S. — Sex of host as a factor in Chagas Disease. *J. Parasit.* 33: 309-404, 1947.
13. KAGAN, I. G. & NORMAN, L. — Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. I. Susceptibility of CFW stock mice for the «Tulahuen» strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 107: 165-167, 1960.
14. KOLODONY, M. H. — Seasonal variations in the intensity of experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in young rats. *Amer. J. Hyg.* 29: 131-133, 1939.
15. MARINKELLE, C. J. & RODRIGUEZ, E. — The influence of environmental temperature on the pathogenicity of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Exp. Parasit.* 23: 260-263, 1968.
16. NEVES, D. P. — Influência da temperatura na evolução do *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13: 155-161, 1971.
17. OKASHA, A. Y. K. — Effects of sub-lethal high temperature on an insect *Rhodnius prolixus* (Stal). III — Metabolic changes and their bearing on the cessation and delay of moulting. *J. Exp. Biol.* 48: 475-486, 1968.
18. OTIENO, L. H. — Influence of ambient temperature on the course of experimental trypanosomiasis in mice. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 66: 15, 1970.
19. PIZZI, T. — Inmunología de la enfermedad de Chagas: Estado actual de problema. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 51: 450-464, 1961.
20. TREJOS, A.; GODOY, G. A.; GREENBLATT, C. & CEDILHOS, R. — Effects of temperature on morphologic variation of *Schyzotrypanum cruzi* in tissue culture. *Exp. Parasit.* 13: 211-217, 1962.
21. TREJOS, A. — Influence of environmental temperature on the pathogenesis of American trypanosomiasis. Scientific Group on Comparative Studies of American and African Trypanosomiasis. Washington 11-16 December, 1967.

Recebido para publicação em 25/8/1978.