

INMUNIZACION A *TRYPANOSOMA CRUZI* CON ANTIGENOS TRATADOS CON DETERGENTES

Dr. Carlos A. Soria
Dr. Donald G. Dusanic

Departamento de Ciencias Biológicas,
Pontificia Universidad Católica, y
Laboratorios Life, Quito

Department of Life Sciences,
Indiana State University, Terre Haute, Indiana

Los métodos químicos empleados en la preparación de antígenos de *Trypanosoma cruzi* han dado resultados variables. Una vacuna preparada con cultivos de *T. cruzi* muertos con timerosal fue reportado por Muniz *et al.*¹, la cual estimulaba la producción de títulos de aglutinación altos en monos, pero era incapaz de proteger contra una infección experimental con formas trypomastigóticas metacíclicas de triatomas. Kagan y Norman² tampoco pudieron proteger ratones inmunizándoles con cultivos de *T. cruzi* muertos con timerosal. Hauschka *et al.*³ empleó formas sanguinolentas y cultivos de *T. cruzi* tratados con formalina como vacunas las cuales tampoco ofrecían protección contra infecciones con formas sanguinolentas. También encontraron que vacunas preparadas con bazos liofilizados de ratones infectados, inducían cierto grado de inmunidad funcional en ratones observando, después de la confrontación, parasitemias más bajas y una li-

gera prolongación en el tiempo de sobrevivencia. Otras preparaciones de *T. cruzi* liofilizadas^{3,4} o congeladas y descongeladas instantáneamente^{5,6} también han creado resistencias significativas en animales inmunizados. Neal y Johson⁷ reportaron estimulación de resistencia en ratones blancos usando antígeno de *T. cruzi* muerto con formalina o con 8—propialactone. Kierszenbaum y Budzko⁸ han demostrado un nivel substancial de resistencia contra *T. cruzi* en ratones inmunizados con cultivos homólogos tratados con perclorato sódico.

El presente trabajo se hizo con vacunas preparadas a base de cultivos de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* tratados con detergentes iónicos y no iónicos. Ratones machos adultos, genéticamente susceptibles^{9,10}, de la raza C3H/Anf,

Trabajo auspiciado parcialmente por becas de investigación AI — 11369 y AI — 14642 de «National Institute of Allergy and Infectious Diseases», de E. U.

fueron inmunizados por varias rutas y fueron confrontados con la altamente infectiva cepa Tulahuén en su forma sanguinolenta. La estabilidad de estas vacunas fue estudiada después de ser conservadas por diferentes períodos de tiempo a diferentes temperaturas. La eficacia de los procedimientos de inmunización fue determinada cuantificando los parásitos de la sangre y de varios tejidos. A la vez, se determinó el tiempo de sobrevivencia y se intentó recobrar parásitos de la sangre y tejidos de animales sobrevivientes, usando técnicas de cultivo de tejidos y subinoculaciones en ratones irradiados.

MATERIALES Y METODOS

Huéspedes

Se usaron ratones machos C3H/Anf de 2 a 3 meses de edad con pesos entre 18 a 19 g. Los animales fueron mantenidos a aproximadamente 21°C en jaulas plásticas conteniendo entre 3 y 5 animales por jaula con libre acceso a pelotillas de comida y agua.

Parásitos

Las formas sanguinolentas de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* fueron colectadas por decapitación de ratones con una infección de 10 días; la sangre infectada fue diluída en 0.55 M buffer fosfato salino (PBS), pH 7. Los animales fueron confrontados por la vía intraperitoneal con 1 ml PBS-sangre conteniendo 1×10^5 — 2×10^5 *T. cruzi* equivalente a 100 — 200 dosis letal 50 (DL50). La

DL50 equivalente a 1×10^3 parásitos se obtuvo de datos de mortalidad observados en grupos de 10 animales infectados con números variables de parásitos.

Los cultivos de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* se hicieron en medio modificado del medio dializado de Dusanic¹¹. Agar nutriente fue preparado con 100 ml extracto de carne Bacto, 5 g de Bacto peptona, 8 g de sodio cloruro y 15 g de agar. El extracto de carne fue preparado con 3 g de polvo de carne Bacto y 1,000 ml de agua bidestilada. La mezcla fue calentada por 1 hr a 50°C con agitación constante y por 5 min adicionales a 80°C. La preparación fue filtrada a través de algodón y se ajustó el pH del filtrado a 7.2 con 5 N hidróxido de sodio a temperatura ambiente. Después de añadir el agar se esterilizó la mezcla por 30 min a 16 lbs de presión guardándose en el refrigerador hasta su uso.

La solución de Locke consistió de una mezcla de 90 ml de solución A y de 10 ml de solución B. La solución A contenía 8 g de cloruro de sodio, 0,2 g de cloruro de potasio, 0.09 g de fosfato de sodio monobásico, 0.38 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, y 900 ml de agua bidestilada.

Setenta y cinco ml de agar nutritivo a 56°C fueron mezclados con 15 ml de sangre defibrinada normal de conejo; esta mezcla fue distribuída en tubos de dialisis (2 cm de diámetro por 56 cm de largo). El tubo amarrado y seguro fue lavado con solución A e insertado en un segundo tubo de dialisis de 2.5 cm de diámetro por 56 cm de largo. Este tubo también fue asegurado y lavado en solución A. Botellas Roux con-

teniendo medio nutritivo de agar sangre en los tubos dobles de diálisis más 90 ml de solución A fueron autoclavados por 20 min a 16 lbs de presión. Una vez que las botellas habían adquirido la temperatura ambiente se añadió 10 ml de solución B estéril a cada una de las botellas. Cada botella así preparada fue inoculada con aproximadamente 5×10^6 trypanosomas e incubada a 27°C durante 21 días. Los trypanosomas que crecieron en la fase líquida fueron colectados por centrifugación a $6,785 \times g$ por 20 min a 4°C en una centrifugadora Sorvall RC2—B. El sobrenadante fue removido y filtrado a través de filtros Millipore de 0.8u. El sedimento fue lavado 3 veces con PBS y resuspendido en el buffer a fin de contar los parásitos con el hemocitómetro.

Preparación de la vacuna

Un ml de suspensión de trypanosomas conteniendo 1×10^9 formas de *T. cruzi* fue mezclado con 0.05 g de colato de sodio (Sigma Chemical C., St. Louis, MO o con 0.05 g de lubrol WX (Imperial Chemical Ltd., London) en 1 ml PBS. Los trypanosomas tratados con colato fueron incubados por 30 min a 0°C . Otros tratados con Lubrol fueron incubados a 21°C ya que no todos los parásitos murieron a 0°C . Al final del período de incubación se añadió 3 ml de PBS frío a cada preparación y observándoles al microscopio de luz se encontró membranas agregadas, material flagelar y trypanosomas sin movimiento.

Las preparaciones con colato fueron dializadas con agitación constante durante 36 hr a 4°C contra alícuotas de 1,200 ml de PBS frío. Se cambió el PBS cada 6 a 12 hr al menos 4 veces durante el período de diálisis. Las muestras tratadas con lubrol fueron centrifugadas a 4°C por 90 min a $134,000 \times g$ en una ultracentrifugadora Beckman L2—65 B. El sobrenadante fue descartado y el sedimento fue suspendido en PBS frío y vuelto a centrifugar en condiciones similares. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue suspendido en 5 ml de PBS. Cinco ml de medio y 50 mg de gelatina en 5 ml PBS sometidos al mismo tratamiento de detergentes que las preparaciones trypanosómicas sirvieron para inyectar ratones control.

No se detectaron parásitos vivos por observaciones microscópicas de las vacunas preparadas o de muestras de sangre de animales vacunados sin confrontar. Muestras de las vacunas (0.1 ml pcr tubo) y muestras de sangre de animales vacunados sin confrontar (10 ul de sangre por tubo) también fueron incubados a 27°C en medio nutritivo de agar sangre¹² donde tampoco se pudieron detectar trypanosomas vivos.

Estudios de inmunización

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal (ip) con 2×10^8 *T. cruzi* de cultivo tratados con detergente y administrados en inyecciones de 1 ml. Otros grupos de 5 ratones fueron inmunizados por la vía subcutánea (sc) o intramuscular (im) con

0.5 ml de vacuna conteniendo 1×10^8 *T. cruzi* tratados con detergente. Animales control fueron inoculados en forma similar con medio, PBS o con gelatina o medio tratado con detergente. Un grupo de 5 animales fue inmunizado una sola vez y confrontado 21 días después; los otros grupos fueron vacunados 3 veces a intervalos de 7 días. Todos los animales fueron confrontados con $1-2 \times 10^5$ formas sanguinolentas a los 21 o 42 días después del último tratamiento. El corazón, hígado y bazo de ratones no inmunizados e inmunizados confrontados fueron examinados buscando formas amastigóticas tisulares durante varios intervalos de tiempo después de la confrontación. Dos grupos de 5 animales cada uno fueron inmunizados con 3 inyecciones de 2×10^8 *T. cruzi* tratados con colato. Los tejidos de cada uno de estos animales fueron examinados a los 15 y 40 días, después de la confrontación. En forma similar se examinaron 15 días después de la confrontación los tejidos de 4 animales vacunados 3 veces con 2×10^8 *T. cruzi* tratados con Lubrol así como los tejidos de aquellos animales controles.

La estabilidad de las vacunas de *T. cruzi* tratadas con colato fue examinada después de permanecer a 4°C por 7 días y a -76°C por 28 días. Ratones recibieron 3 inyecciones ip cada una de 1 ml. equivalente a 2×10^8 formas de cultivo de cada preparación guardada a 4°C (5 ratones) o a -76°C (5 ratones). Un grupo de 5 ratones sirvió de control y fue administrado PBS. Todos los animales fueron confrontados con 1×10^5

21 días después del último tratamiento. Seguidamente se determinaron las parasitemias de la sangre y los tiempos de sobrevivencia.

Monitoreo de las infecciones

Se contaron los parásitos trypomastigóticos sanguinolentos distinguiéndoles entre las formas largas de movimiento rápido y las formas pequeñas y gruesas caracterizadas por sus movimientos lentos. El conteo se hizo en muestras de sangre obtenidas entre el 4º y 12º día y en el día 40 después de la confrontación, al menos que se indique lo contrario. Las parasitemias de la sangre fueron cuantificadas de acuerdo al método modificado de Roberson *et al*¹³. Cuatro μl de sangre se colectaron de la vena caudal de cada ratón utilizando una micropipeta (Clay Adams, Parsippany, NJ); esta sangre fue transferida uniformemente a un portaobjetos bajo un cubreobjetos de 18 x 18 mm. Los parásitos fueron contados en 32 campos microscópicos usando una magnificación de 400 x y un micrómetro ocular calibrado (American Optical Corp., Buffalo, NY). Los resultados se expresaron como el número de *T. cruzi* por ml de sangre.

El conteo de parásitos en tejidos se efectuó en impresiones de órganos coloreados con Giemsa, de acuerdo al método desarrollado por Stauber^{14,15} para *Leishmania*. Varias impresiones de cada órgano fueron examinados microscópicamente a una magnificación de 1,000 x. Los resultados fueron expresados como el número de formas amasti-

góticas por 1,000 núcleos de células huéspedes.

Aislamiento de T. CRUZI de ratones inmunizados que sobrevivieron la infección.

Los métodos usados por Martínez—Silva *et al*¹⁶ y por Allain y Kagan¹⁷ se siguieron con ciertas modificaciones. Se examinaron a los animales que fueron inmunizados 3 veces con 2×10^8 *T. cruzi* tratados con colato; estas vacunas fueron administradas ip con 7 días de intervalo y los animales fueron confrontados con 1×10^5 *T. cruzi* sanguinolento trypromastigótico a los 21 días después de la última vacuna. Al tiempo de correr este experimento estos animales habían sobrevivido 3 meses después de la confrontación.

Diez de estos ratones y 3 animales controles no inmunizados confrontados, estos últimos con parasitemia de 10 días fueron sangrados por punción cardíaca en condiciones estériles. Los corazones fueron removidos ascépticamente y homogenizados en PBS estéril. La porción líquida de cada homogenado fue inoculado ip en un ratón adulto previamente irradiado con 300 rads. Cinco décimas de ml de la sangre obtenida por punción cardíaca fue mezclada con una cantidad igual de PBS estéril conteniendo 5 unidades de heparina, 100 unidades de penicilina G y 100 ug de estreptomina, por ml. Cada muestra fue centrifugada a 192 x g por 100 min y el sobrenadante fue transferido a tubos estériles para ser centrifugados de nuevo a 1,203 x g por 15 min. El se-

dimento fue suspendido en 0.5 ml PBS y cantidades iguales fueron inoculadas en 2 tubos de cultivo de tejidos por cada muestra.

El cultivo de tejidos consistió de células de riñón de mono Rhesus en tubos (Gibco, Gram Island, NY). Las células en cada tubo crecieron en 2 ml de medio basal de Eagle (BME) conteniendo 0.5 por ciento suero de feto de bovino y 50 unidades de penicilina G más 50 ug de estreptomina, por ml. Cada cultivo fue provisto de medio fresco 2 veces a la semana. En los cultivos inoculados con el material de experimentación se hizo el primer cambio del medio a los 3 días después de la inoculación. Muestras de la porción líquida fueron removidas 2 veces a la semana con una aguja bacteriológica y se chequeó microscópicamente por presencia de parásitos. La sangre de los animales irradiados que recibieron homogenados de tejido de corazón fue examinada a los 14 y 28 días contando 100 campos microscópicos a una magnificación de 400 x.

Análisis estadístico

La prueba t de Estudiante fue usada para indicar diferencias entre medianas de las parasitemias estudiadas. La mortalidad fue analizada con la prueba de Kolmogorov-Smirnov "goodness of fit" y se reportaron diferencias cuando el nivel de significancia fue menos de 0.05¹⁸.

RESULTADOS

La figura 1 ilustra las parasitemias de ratones inmunizados y no inmunizados confrontados con 1×10^5 trypomastigo-

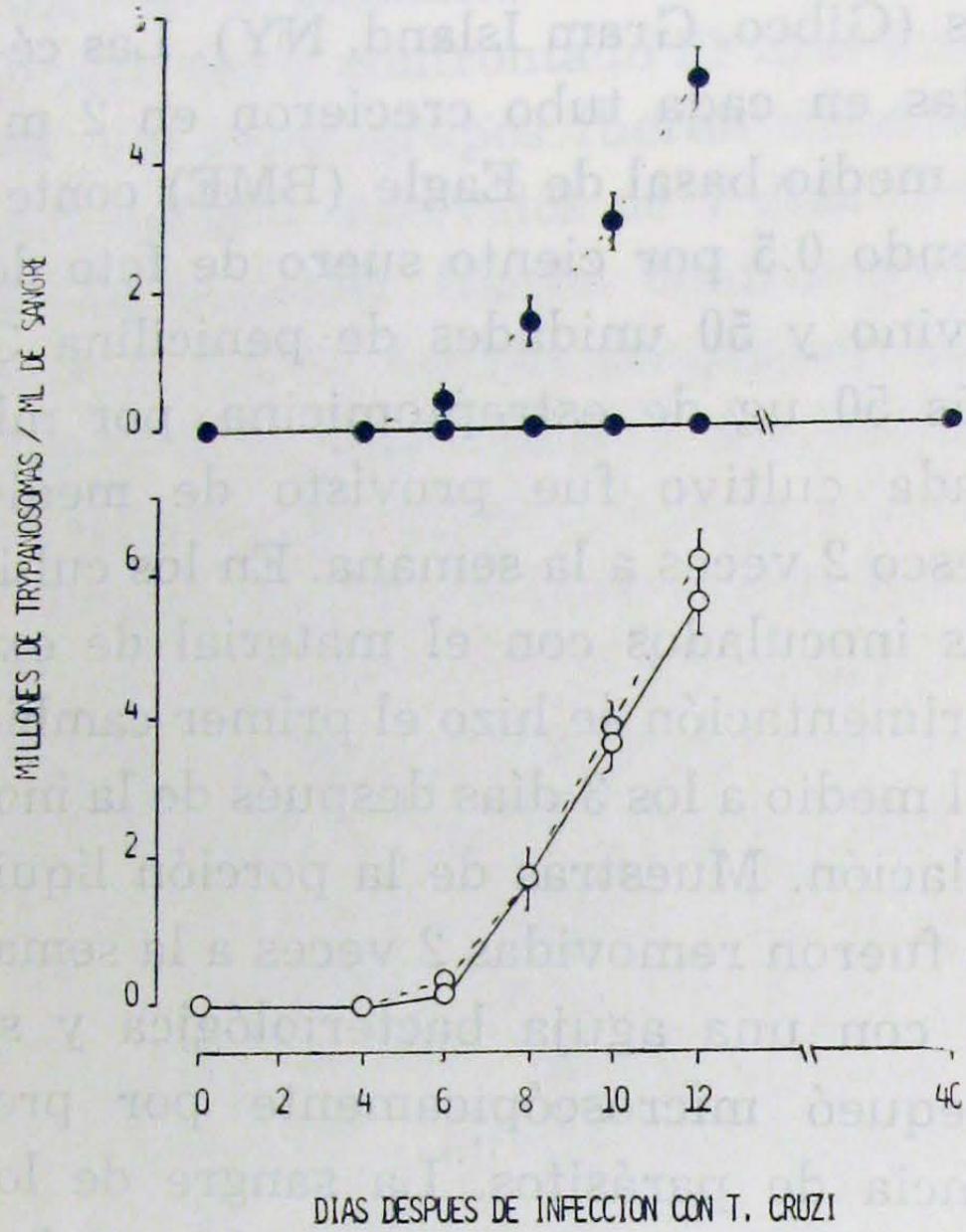


FIGURA 1.—Parasitemias en ratones inmunizados con 2×10^8 formas de cultivo de *T. cruzi* tratados con colato (●—●) o con lubrol (○—○) administrados 3 veces a 7 días de intervalo. Ratones control recibieron PBS y medio de cultivo libre de parásitos (○—○). Un grupo control (○—○) no recibió tratamiento. Todos los animales fueron confrontados con 1×10^5 *T. cruzi* 21 días después de la última inyección. Datos están presentados como la mediana \pm error standar

tes. Durante varios días después de la confrontación no se detectaron parásitos entre 20 y 40 por ciento de los ratones inyectados 3 veces con cultivos de *T. cruzi* tratados con colato. El resto de este grupo de animales mostró 1 parásito en los 32 campos microscópicos contados o lo que equivaldría a tener 4×10^4 parásitos por ml de sangre. En

contraste los animales inmunizados 3 veces con cultivos de *T. cruzi* tratados con Lubrol desarrollaron parasitemias similares a las de los animales control. Además, aquellos animales que recibieron vacunas preparadas con colato, sobrevivieron la infección (Fig. 2) mien-

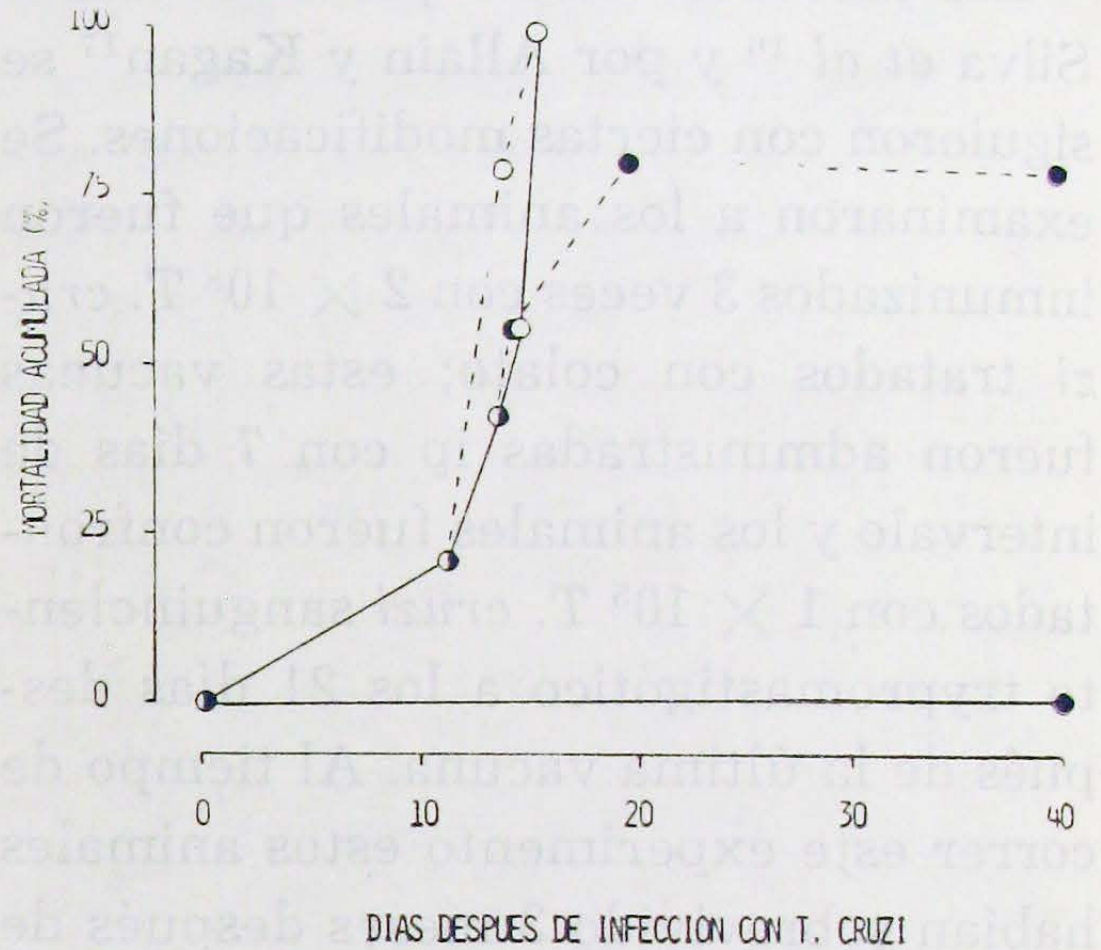


FIGURA 2.—Mortalidades de ratones vacunados con 2×10^8 formas de cultivo de *T. cruzi* tratados con colato (●—●) o lubrol (○—○) administrados 3 veces a 7 días de intervalo. Ratones control recibieron PBS y medio de cultivo libre de parásitos (○—○). Un grupo control (○—○) no recibió tratamiento. Todos los animales fueron confrontados con 1×10^5 *T. cruzi* 21 días después de la última inyección.

tras que aquellos animales que recibieron vacunas preparadas con Lubrol, tuvieron mortalidades similares a los controles.

El efecto de 1 (0) 3 inyecciones de *T. cruzi* preparadas con colato se demostró por la presencia de menos parásitos en la sangre de animales inmunizados con 3 dosis, en contraste con la parasitemia de los animales que recibieron una única dosis (Fig. 3), aunque ambos grupos presentaron menos parásitos que

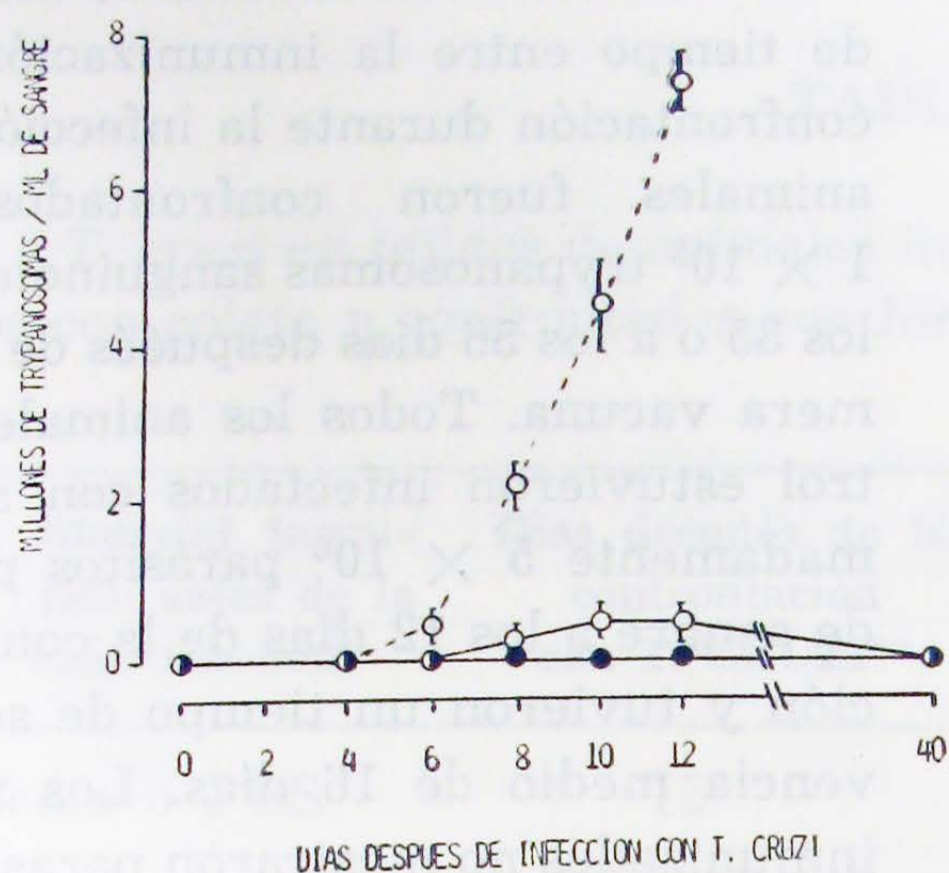


FIGURA 3.— Parasitemias en ratones inmunizados con 2×10^8 formas de cultivo de *T. cruzi* tratados con colato. Animales recibieron por la vía intraperitoneal una (○—○) o 3 vacunas (●—●) a 7 días de intervalo. Ratones control (○—○) fueron administrados 3 veces 1 ml. de PBS. Todos los animales fueron confrontados con 2×10^5 *T. cruzi* 21 días después de la última inyección. Datos están presentados como la mediana \pm error standar.

los animales control. Cuarenta por ciento de los animales inmunizados 3 veces no mostraron parasitemias detectables. Los otros 60 por ciento presentaron 1 flagelado en los 32 campos examinados. Solamente trypomastigotes gruesos de movimiento lento fueron observados en estas preparaciones. Todos los animales inmunizados con una sola dosis vacunal mostraron parasitemias significativamente más elevadas en las que se observó tanto los trypomastigotes gruesos, de movimiento lento, como las formas largas caracterizadas por sus movimientos rápidos. El máximo número de esos últimos trypomastigotes fueron detectados a los diez días después de la confrontación (0.8×10^5 formas largas por ml. de sangre); en contraste,

en los animales control se detectaron 2.6×10^5 formas largas por ml. de sangre a los 8 días de la infección.

Ninguno de los animales que recibieron 3 dosis de vacuna preparada con colato murieron de la infección, sin embargo, 60 por ciento de los animales inmunizados con una sola dosis vacunal murieron de infección a los 32 días, pero la mortalidad en este grupo fue más baja que en el grupo control (Fig. 4).

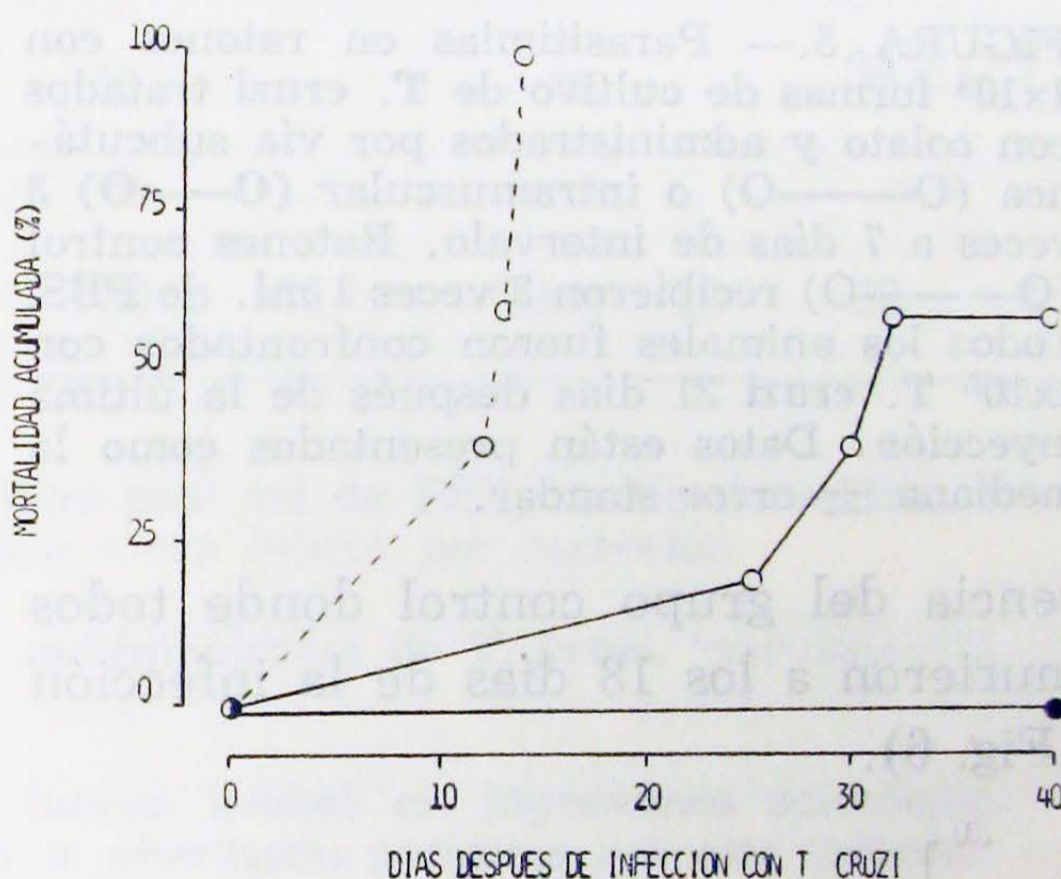


FIGURA 4.— Mortalidades de ratones inmunizados con 2×10^8 formas de cultivo de *T. cruzi* tratados con colato. Animales recibieron por la vía intraperitoneal una (○—○) o 3 vacunas (●—●) a 7 días de intervalo. Ratones control (○—○) fueron administrados 3 veces 1 ml. de PBS. Todos los animales fueron confrontados con 2×10^5 *T. cruzi* 21 días después de la última inyección.

Se encontraron pocos parásitos en la sangre de animales inmunizados 3 veces por la vía im o sc (Fig. 5). No se detectó parasitemias en 40 por ciento de los animales; el 60 por ciento restante mostró 1 trypanosoma (forma gruesa) en los 32 campos examinados. No se detectaron parásitos largos de movimientos rápidos y ninguno de los animales vacunados murió de infección, a dife-

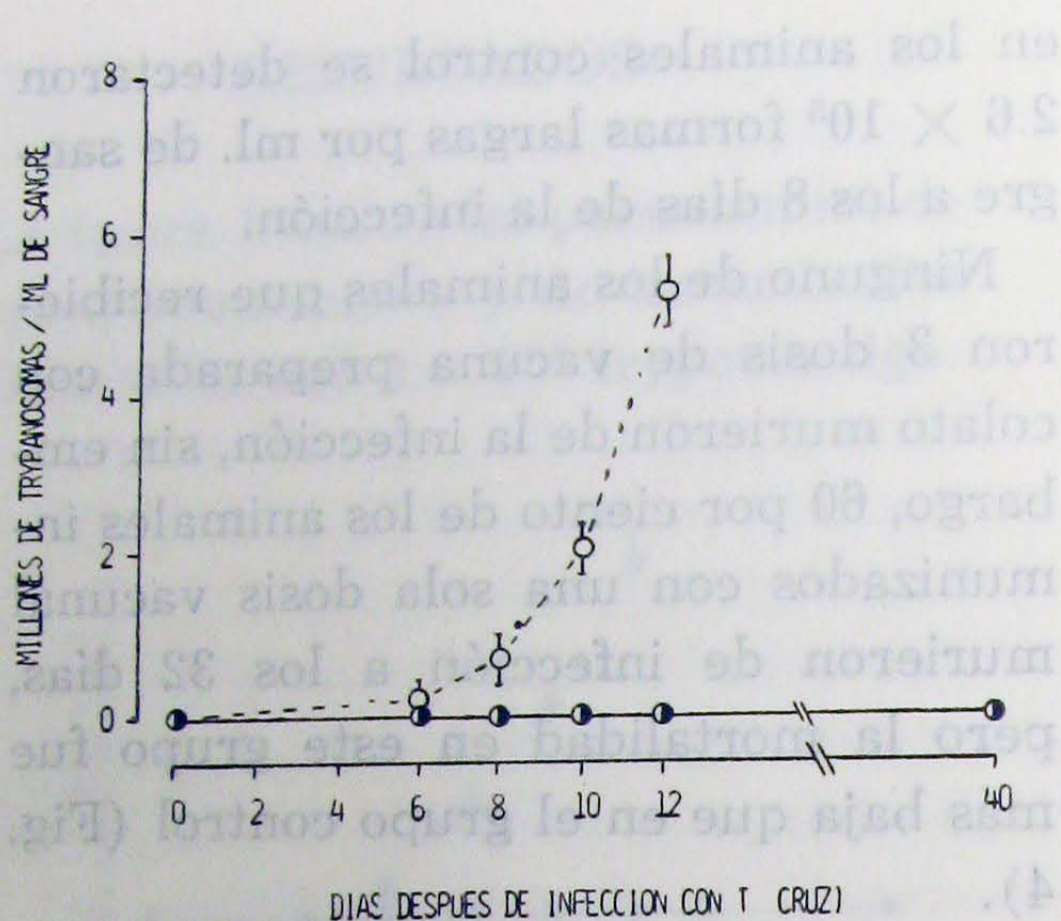


FIGURA 5.— Parasitemias en ratones con 1×10^8 formas de cultivo de *T. cruzi* tratados con colato y administrados por vía subcutánea (○—○) o intramuscular (●—●) 3 veces a 7 días de intervalo. Ratones control (○—○) recibieron 3 veces 1 ml. de PBS. Todos los animales fueron confrontados con 1×10^5 *T. cruzi* 21 días después de la última inyección. Datos están presentados como la mediana \pm error standar.

rencia del grupo control donde todos murieron a los 18 días de la infección (Fig. 6).

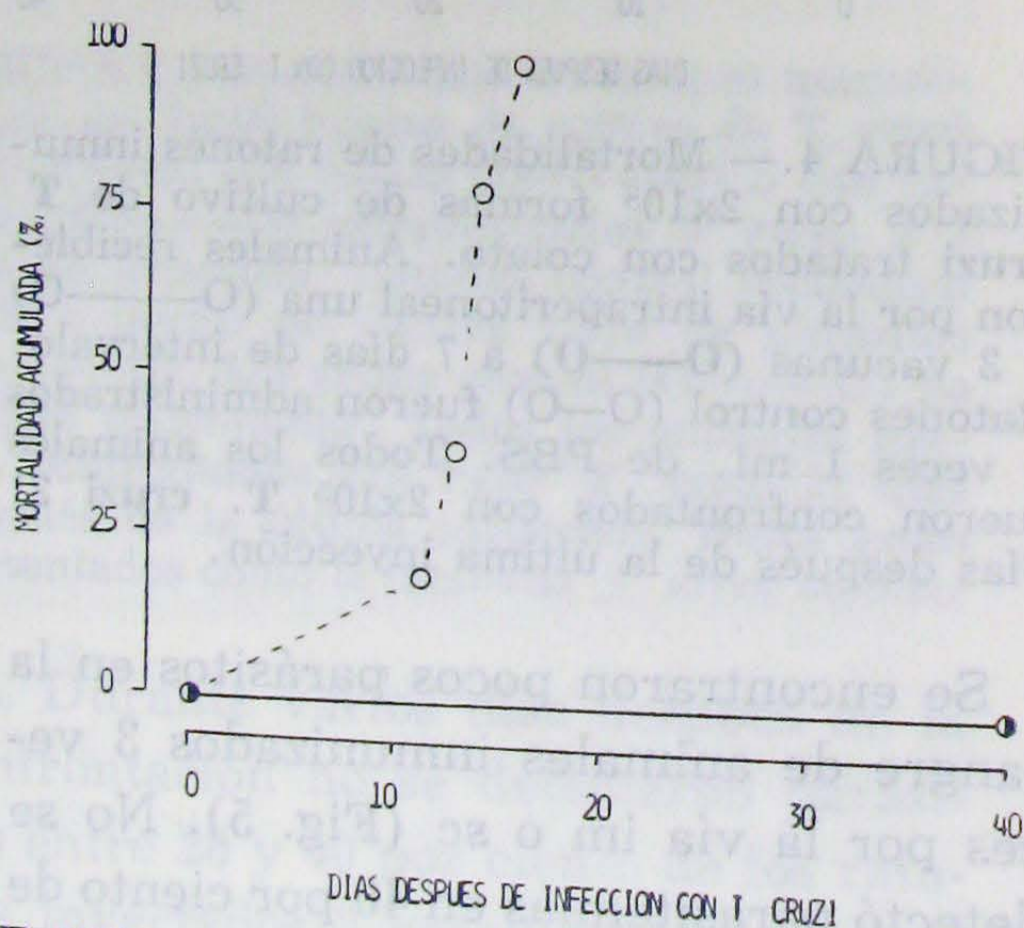


FIGURA 6.— Mortalidades de ratones inmunizados con 1×10^8 formas de cultivo de *T. cruzi* tratados con colato y administrados por vía subcutánea (○—○) o intramuscular (●—●) 3 veces a 7 días de intervalo. Ratones control (○—○) recibieron 3 veces 1 ml. de PBS. Todos los animales fueron confrontados con 1×10^5 *T. cruzi* 21 días después de la última inyección.

Se estudiaron los efectos de intervalo de tiempo entre la inmunización y la confrontación durante la infección. Los animales fueron confrontados con 1×10^5 trypanosomas sanguinolentos a los 35 o a los 56 días después de la primera vacuna. Todos los animales control estuvieron infectados con aproximadamente 5×10^6 parásitos por ml. de sangre a los 12 días de la confrontación y tuvieron un tiempo de sobrevivencia medio de 16 días. Los ratones inmunizados no mostraron parasitemias detectables por exámenes microscópicos de muestras de sangre y además sobrevivieron la infección. Formas tisulares amastigóticas, fueron observadas en animales control no inmunizados y en los animales que recibieron vacuna tratada con Lubrol. No se detectaron parásitos en los tejidos de los ratones inmunizados con vacunas preparadas con colato y confrontados a diferentes períodos de tiempo (Tabla I.)

Las vacunas a base de cultivos de *T. cruzi* tratados con colato probaron ser inestables al ser guardadas a 4°C por 7 días o a -76°C por 28 días ya que al vacunar ratones con estas preparaciones y luego confrontarlos, se observó que las parasitemias de la sangre a los 12 días de la confrontación y el tiempo de sobrevivencia, eran similares a las de los animales control.

Muestras de sangre tomadas de 2 animales del grupo que recibió vacunas tratadas con colato y que resistieron la confrontación con *T. cruzi*, mostraron parásitos después de 21 o 24 días en cultivo de tejidos (Tabla II). Muestras de sangre del resto de estos animales in-

TABLA 1

T. cruzi en tejidos de animales inmunizados con cultivos homólogos tratados con colato y confrontados con formas sanguinolentas.

Número de ratones	Material inoculado antes de la confrontación*	Días después de la confrontación con <i>T. CRUZI</i> **	Formas amastigóticas / 1000 núcleos***		
			Corazón	Hígado	Bazo
5	Medio o PBS	15	154 \pm 16	62 \pm 13	34 \pm 7
5	<i>T. cruzi</i> (colato)	15	—	—	34 \pm 7
5	<i>T. cruzi</i> (colato)	40	—	—	—
4	<i>T. cruzi</i> (colato)	15	153 \pm 11	70 \pm 13	30 \pm 1

* Ratones fueron inoculados 3 veces cada 7 días con 1 ml de PBS, medio de cultivo o 2×10^8 formas de cultivo tratados con colato o con lubrol, por inyección.

** Confrontación consistió de 1×10^5 formas sanguinolentas de *T. cruzi*, inoculadas 21 días después de la última inyección.

*** Mediana \pm desviación estandar. Conteos fueron hechos en impresiones coloreadas con Giensa. El signo negativo indica que no se observaron parásitos por este método.

inmunizados no mostraron parásitos en cultivo de tejidos aún conservándolos durante 28 días. Al contrario, las muestras de sangre de ratones infectados no inmunizados presentaban abundantes parásitos a los 7 días de inoculados en cultivo de tejidos.

Ocho de los 10 ratones irradiados inoculados con homogenados de corazón de ratones inmunizados que resistieron la confrontación con *T. cruzi*, mostraron escasos parásitos en cultivo de tejidos a los 28 días de incubación. En cambio la sangre de los animales irradiados inoculados con homogenados de corazón de ratones no inmunizados, con 10 días

de infección, dio lugar a la aparición de abundantes números de parásitos después de 14 días en cultivo de tejidos (Tabla II).

DISCUSION

La inmunización contra las formas sanguinolentas de *T. cruzi* con cultivos homólogos tratados con colato, produce resistencia a la confrontación letal, utilizando animales conocidos por su susceptibilidad a la cepa virulenta Tula-huén de este parásito. El colato sódico ha sido reportado como un moderado detergente iónico que se combina con

TABLA II

Detección de *T. cruzi* de la sangre y tejidos de animales inmunizados que sobrevivieron infecciones letales con formas sanguinolentas.

Inmunización antes de la confrontación*	Método de detección de <i>T. CRUZI</i>	
	En cultivo de tejidos	En ratones irradiados
<i>T. cruzi</i> (colato)	2/10**	8/10
Ninguna	3/3	3/3

* Ratones inmunizados recibieron 3 veces a 7 días de intervalo el equivalente a 2×10^8 *T. cruzi* en cultivo tratados con colato. Los animales sobrevivieron la confrontación con 1×10^5 formas sanguinolentas de *T. cruzi*, por 3 meses al tiempo de ser sacrificados para estos experimentos. Se obtuvo la sangre y el corazón (homogenizado) de cada uno de estos animales incluyendo los controles no inmunizados y se inocularon en 2 tubos de cultivo de tejido de riñón de mono Rhesus y en 1 ratón irradiado (300 rads), por cada animal estudiado.

** Número de ratones encontrados con infección sobre el número total observado.

las membranas causando alteraciones en su estructura pero con muy poca desnaturalización de sus componentes¹⁹. La interacción del colato con los parásitos, puede exponer antígenos en tal forma que son mejor reconocidos por células inmunocompetentes²⁰ responsables de despertar la respuesta inmune contra los parásitos. El lubrol utilizado de acuerdo a la metodología de estos experimentos, parece alterar la antigenicidad de las fracciones trypanosómicas utilizadas después de que fueron centrifugadas a $134,000 \times g$. en tal forma que no fueron capaces de provocar alguna resistencia.

La inmunización con 3 dosis cada una equivalente a 2×10^8 *T. cruzi* de cultivos tratados con colato y administrados a 7 días de intervalo, previene la mortalidad y reduce las parasitemias de la

sangre y de los tejidos a niveles que no son fácilmente detectables con métodos convencionales. Un estímulo de la actividad fagocitaria no parece contribuir significativamente a la resistencia observada, ya que la administración de medio de cultivo o gelatina, tratados o no con colato, no parece alterar el curso de las infecciones. Aún más, el desarrollo de infecciones letales en animales controles inoculados con medio de cultivo de *T. cruzi*, parecen indicar que exoantígenos o antígenos provenientes del metabolismo de *T. cruzi* en cultivo no intervinieron en el desarrollo de resistencias.

Los animales vacunados con cultivos tratados con colato exhibieron resistencias a infecciones letales con formas sanguinolentas de *T. cruzi* por al menos 42 días después de la última inmuniza-

ción. Tal inmunidad funcional parece también extenderse a los tejidos ya que el número de formas amastigóticas en los animales inmunizados se redujo a niveles que no pudieron ser detectados por la técnica de impresión de tejidos. De todas formas, se logró recobrar parásitos de la sangre y tejidos de animales inmunizados por inoculación en cultivo celular de riñón de mono o a su vez por inoculación en ratones irradiados no infectados. Estas técnicas son más sensibles que las examinaciones microscópicas de sangre o de impresiones de tejidos provenientes de animales que resistieron la infección. Cuando se encontraron parásitos en la sangre de animales inmunes, éstos eran de las formas trypomostigóticas lentas y gruesas que se cree son resistentes a la respuesta inmunológica²¹. Las formas delgadas, caracterizadas por su movimiento rápido en muestras de sangre fresca, no fueron encontradas en animales vacunados con 3 inyecciones de cultivos con *T. cruzi* tratados con colato. Ante estos resultados, es de esperarse que estudiando el pleomorfismo^{10,21} durante el curso de la infección en animales inmunizados o no inmunizados, se encuentren diferencias antigénicas e infectivas muy significativas entre estas formas.

La inmunización efectiva lograda utilizando la vía intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, parece ser dependiente del número de dosis administradas y del uso inmediato de estas después de su preparación ya que su potencial para estimular protección, se pierde cuando dichas vacunas se guardan a 4°C o a -76°C. otros autores

también han reportado inestabilidad antigénica en varios homogenados de *T. cruzi* guardados en condiciones similares previo a su uso²². Al contrario, otros autores^{7,23} han podido mantener sus preparaciones antigénicas estables a diferentes temperaturas. Es de esperar que una caracterización física y bioquímica de esta vacuna preparada con colato y conservada a diferentes temperaturas durante varios intervalos de tiempo, nos de información sobre su inestabilidad relativa. Por otro lado un estudio comparativo inmunológico de componentes aislados de esta vacuna, revelaría las fracciones antigénicas envueltas en el estímulo de la resistencia contra infecciones letales de *T. cruzi* exhibidas por animales inmunizados.

Summary

C3H / Anf mice were immunized with Lubrol or cholato — treated culture forms of the Tuluhuén strain of *Trypanosoma cruzi* and subsequently challenged with the homologous bloodstream forms. The equivalent of 1×10^8 — 2×10^8 detergent-treated culture forms were injected intraperitoneally, intramuscularly or subcutaneously. The mice were challenged intraperitoneally with 1×10^5 — 2×10^5 bloodstream forms equivalent to 100--200LD₅₀ administered 21 or 42 days after immunization. The effects of immunization were measured by recording survival times, noting blood and tissue parasitemias, and by attempting to recover parasites from the challenged mice in Rhesus monkey kidney tissue cell cultures and in irradiated mice.

Immunized mice challenged with *T. cruzi* had significantly lower parasitemias than groups of control animals. Cholate-treated culture forms were more effective vaccines than Lubrol-treated trypanosomes. Bloodstream forms when observed in immunized mice were predominantly slow moving stumpy trypomastigotes. Amastigote tissue parasitemias in these mice were reduced to levels that could not be detected by microscopic examinations of tissue imprints. Unimmunized infected control mice died with high parasitemias of both stumpy and slender trypomastigotes. The effectiveness of the vaccines was dependent upon the number of injections administered. Animals

immunized intraperitoneally, intramuscularly, or subcutaneously acquired similar resistance and there were no differences between groups of these mice challenged either 21 or 42 days after immunization. Metabolic product antigens or exoantigens released by the trypanosomes while in culture and non-functional immunity due to a nonspecific stimulation of the phagocytic activity did not seem to enhance resistance, since cholate-treated or untreated medium and gelatin did not affect the course of the infections. The cholate-treated *T. cruzi* culture form vaccines lost the ability to confer resistance when stored at 4°C for 7 days or at -76°C for 28 days.

REFERENCIAS

- 1 Muniz, J., Nobrega, G., y de Cunha, A. M., 1964. Ensaio de vacinação preventiva e curativa nas infeções pelo *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 44: 529-541.
- 2 Kagan, I. G., y Norman, L., 1961. Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of *T. cruzi*. J. Infect. Dis., 108: 213-217.
- 3 Hauschka, T. S., Goodwin, M. B., Palmquist, J., y Brown, E., 1950. Immunological relationship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30: 1-16.
- 4 Seah, S.K.K., Marsden, P. D., Voller, A., y Pettitt L. E., 1974. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rhesus monkeys, the acute phase. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 68: 63-69.
- 5 Johnson, P., Neal, R. A., y Gall D., 1963. Protective effect of killed *Trypanosoma* vaccines with incorporated adjuvants. Nature, 200: 83.
- 6 Kaneda, Y., 1973. Protective effects of disintegrated culture forms of *Trypanosoma cruzi* on the mortality of mice after challenge. Jap. J. Parasitol., 22: 146-154.
- 7 Neal, R. A., y Johnson, P., 1977. Immunization against *Trypanosoma cruzi* using killed antigens and with saponin as adjuvant. Acta Trop., 34: 87-96.
- 8 Kierszenbaum, F., y Budzko, D. B., 1975. Immunization against experimental Chagas' disease by using forms of *Trypanosoma cruzi* killed with a solution of sodium perchlorate. Infect. Immun., 12: 461-465.
- 9 Trischmann, T. M. y Bloom, B.R. 1982. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun., 35: 546-551.
- 10 Carvalho, R.M.G., Meirelles, M.N.L., de Souza, W. y Leon W. 1981. Isolation of the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with mouse ma-

- crophages in vitro. *Infect. Immun.*, **33**: 546-554.
- 11 Dusanic, D. G., 1969. Cultivation of *Trypanosoma lewisi* in a dialysate medium I. Amino acid alterations during growth. *Comp. Biochem. Physiol.*, **30**: 895-901.
- 12 Soria, C.A., y Dusanic, D.G., 1975. Comparative studies of *Trypanosoma vespertilionis* Battaglia and *Trypanosoma dionisii* Bettencourt and Franca. *J. Protozool.*, **22**: 509-513.
- 13 Roberson, E.L., Chapman, W.L. y Hanson, W.L., 1973. The effects of total-body x-irradiation on *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' disease) in mice and rats. *Z. Parasitenk* **41**: 83-94.
- 14 Stauber, L.A., 1958. Host resistance to the Dhartoum strain of *Leishmania donovani*. Pages 80-96 in Symposium on Resistance and Immunity in Parasitic Infections. The Rice Institute Pamphlet, vol. XLV, The Rice Institute, Houston.
- 15 Stauber, L.A., 1963. Some aspects of immunity to intracellular protozoan parasites. *J. Parasitol.*, **49**: 3-11.
- 16 Martínez-Silva, R., López, V.A., Colon, J.O., y Chiriboga, J., 1969. Isolation of *Trypanosoma cruzi* from blood of acutely and chronically infected mice in tissue culture. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **18**: 879-884.
- 17 Allain, D.S., y Kagan, I.G., 1974. Isolation of *Trypanosoma cruzi* in an acutely infected patient. *J. Parasitol.*, **60**: 526-527.
- 18 Zar, J. H. 1974. **Biostatistical Analysis** Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- 19 Razin, S., 1972. Reconstitution of biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **265**: 241-296.
- 20 Hayes, M.M., y Kierszenbaum, F. 1981. Experimental Chagas' disease. Kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun*, **31**: 1117-1124.
- 21 Brener, Z., 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi* *An. Rev. Microbiol* **27**: 347-382.
- 22 González-Cappa, S.M., Cantarella, A. J., Lajmanovich, S., y Segura, E.S., 1976. Experimental Chagas' disease: studies on stability of a protective antigen. *J. Parasitol.*, **62**: 130-131.
- 23 Goble, F.C., 1970. South American trypanosomes. Pages 597-689 in J. Jackson, R. Herman, and I. Singer, eds., **Immunity to Parasitic Animals**, Vol. 2. Appleton-Century-Crofts, New York.