

# IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM «VACINA» VIVA AVIRULENTA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

## II — Ensaio da avaliação do tempo de eficiência da vacina

Humberto Menezes \*

*Camundongos "vacinados" com vacina viva avirulenta de T. cruzi se mostraram protegidos contra infecção virulenta, até 20 semanas após a imunização.*

*Essa proteção foi inferior à observada após 4 semanas de imunização e menor ainda do que a apresentada por animais infectados 4 semanas após a "vacinação" e reinfectados 15 semanas depois. Neste último caso, a primeira infecção parece ter atuado como uma dose de reforço.*

*O Autor assinala a dificuldade em determinar o tempo de validade da vacina, em virtude da resistência natural apresentada com a idade, mesmo pelos animais mais sensíveis.*

Dentre os vários fatores que se têm de levar em conta para o uso prático de uma vacina qualquer, o seu tempo de eficácia é um dos principais.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o período de eficiência da "vacina" viva de *Trypanosoma cruzi* que vimos estudando há algum tempo e que já foi assunto de outras comunicações (2,3).

### MATERIAL E MÉTODO

1 — Um grupo de nove camundongos albinos com 10 g de peso foi vacinado. Cada animal recebeu por via subcutânea  $1,1 \times 10^7$  parasitas vivos da cepa Y avirulenta, mantida em meio da cultura de Packchanian. A cultura tinha 30 dias de idade e o líquido de condensação foi centrifugado e lavado várias vezes em solução salina.

A vacina foi utilizada logo após o seu preparo.

Uma pesquisa de parasitas no sangue circulante, pela técnica da gôta espessa,

foi feita no 8.º dia após a vacinação, com resultado negativo.

Vinte semanas após, todos os animais "imunizados" e mais 9 outros da mesma idade e origem foram infectados, cada, com 5.000 parasitas/g de peso.

Os tripanosomas infectantes eram de cepa Y virulenta mantida em camundongos.

Parasitemias, pela técnica de Pizzi-Brenner (1), foram realizadas no 8.º, 15.º e 30.º dia após a infecção.

O percentual de sobrevida foi relacionado com as datas acima referidas.

Ao fim do 30.º dia, todos os animais sobreviventes foram sacrificados para a realização de exame histopatológico.

2 — Um grupo de oito camundongos albinos com 10g de peso foi vacinado.

Cada animal recebeu por via subcutânea dose idêntica da mesma "vacina" do grupo anterior.

Oito dias após a imunização foi feita uma pesquisa de parasitas no sangue circulante.

\* U.S.P. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Recebido para publicação em 21-8-69.

Quatro semanas após o emprêgo da "vacina" todos os animais foram infectados com 5.000 parasitos virulentos por grama de peso.

Os tripanosomas infectantes eram da mesma cepa Y. virulenta, mantida em camundongos.

Quinze semanas depois da primeira infecção os animais foram submetidos a uma segunda, idêntica à anterior.

Simultaneamente um grupo controle de 8 camundongos, com a mesma idade, foi infectado.

Parasitemias pela mesma técnica anteriormente descrita foram realizadas nos períodos já mencionados.

A experiência foi considerada encerrada no 30.º dia após a segunda infecção, quando foram sacrificados todos os animais sobreviventes para a obtenção de material para exame histológico.

## RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 e os Gráficos I e II resumem os dados obtidos nos dois experimentos.

A imunização conferida pela "vacina" prolongou-se até 20 semanas, embora com menor eficiência (no que diz respeito à parasitemia) do que nos casos em que os animais foram infectados na 4.ª semana pós "vacinação" (2,3).

No que concerne à sobrevida, o resultado foi excelente, mas não diferiu do dos animais controles. Isto se deve, certamente, à idade dos animais de ambos os grupos.

O exame histológico revelou nos animais "vacinados" a existência de vários focos de infiltração histio-linfocitária no miocárdio, especialmente localizadas nas bases ventriculares (Fig. 1).

Não foi possível a identificação de pseudocistos nos vários cortes examinados.

No fígado puderam ser vistos, com frequência, pequenos acúmulos histio-linfocitários no parênquima (Fig. 2) e raramente grande infiltração de alguns espaços porta por histiócitos, linfócitos e eosinófilos.

Em nenhum caso foram vistos pseudocistos.

Nos camundongos do grupo controle, a infiltração celular inflamatória, apesar de

não ter sido maior do que a de maior intensidade entre os animais "vacinados", se achava acompanhada de vários pseudocistos íntegros e rompidos (Fig. 3).

No fígado, havia amplas áreas de necrose de coagulação (Fig. 4), grande infiltração celular inflamatória dos espaços portais, grandes acúmulos histio-linfocitários no parênquima e pronunciada hiperplasia e hipertrofia das células de Küpffer. Leishmaniídeos foram vistos em grande quantidade.

Na segunda experiência, resumida na Tabela 2 e no Gráfico 2, verificou-se uma total proteção dos animais "vacinados" e infectados com ausência de parasitas no sangue periférico e de casos fatais.

O exame histológico dos camundongos "vacinados" mostrou no coração raríssimos e discretíssimos aglomerados de linfócitos e histiócitos (Fig. 5), geralmente sub-epicárdicos. Não foram encontrados parasitas.

No fígado, as lesões eram também extremamente discretas (Fig. 6), igualmente sem parasitas.

Nos animais controles, o processo celular inflamatório no coração era bastante pronunciado, embora o número de pseudocistos fôsse diminuto (Fig. 7). No fígado, além dos focos de infiltração histio-linfocitária do parênquima, havia grande acúmulo de histiócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos nos espaços portais, bem como áreas de necroses de coagulação dos hepatócitos (Fig. 8).

Em nenhum dos casos examinados foi possível identificar parasitas no fígado.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O emprêgo de "vacina" viva avirulenta confere a camundongos uma imunidade de longa duração, imunidade esta que se exalta se o animal sofre uma infecção virulenta pouco tempo após a imunização. Já vimos em trabalhos anteriores (2,3) que esta primeira infecção, quatro semanas após o emprêgo da "vacina", é discreta, com muito baixa parasitemia e discretíssimas lesões orgânicas (1,4,5).

A julgar pelo quadro histológico dos animais "vacinados" e infectados 20 semanas após, a imunização foi de grau inferior àquela obtida com quatro sema-

TABELA 1

Camundongos infectados 20 semanas após vacinação

	Número	Número de parasitas 5mm <sup>3</sup> de sangue		
		Dias após a infecção		
		8	15	30
VACINADOS	1	525	35	0
	2	630	0	0
	3	—	—	—*
	4	2.590	35	0
	5	945	0	0
	6	0	0	0
	7	1.680	0	0
	8	7.875	7.350	0
	9	175	0	0
	MÉDIA	1.802	927	0
	MEDIANA	787	0	0
CONTROLES	1	2.730	2.765	0
	2	4.725	2.555	0
	3	3.920	560	0
	4	7.280	595	0
	5	3.290	—	—
	6	2.520	420	0
	7	2.485	805	0
	8	6.125	4.410	0
	9	3.780	1.610	0
		MÉDIA	4.095	1.715
	MEDIANA	3.780	1.207	0

\* Encontrado morto 90 dias após a vacinação.

nas de "vacinação" e menor ainda que a apresentada pelos animais com prévia infecção virulenta. Esta última agiu como uma dose de reforço, nos sugerindo no futuro o emprêgo de mais de uma dose de "vacina" na imunização dos animais.

A baixa mortalidade verificada em todos os grupos de ambas as experiências reflete a dificuldade que se tem em fazer

uma observação, a longo prazo, da imunidade adquirida em animais de laboratório. É que estes, mesmo em se tratando de camundongos que são bem sensíveis à infecção por *T. cruzi*, se tornam resistentes, com o evolver da idade. As parasitemias podem atingir cifras elevadas, porém a mortalidade se mantém em níveis insignificantes, limitando o valor das conclusões.

GRÁFICO I

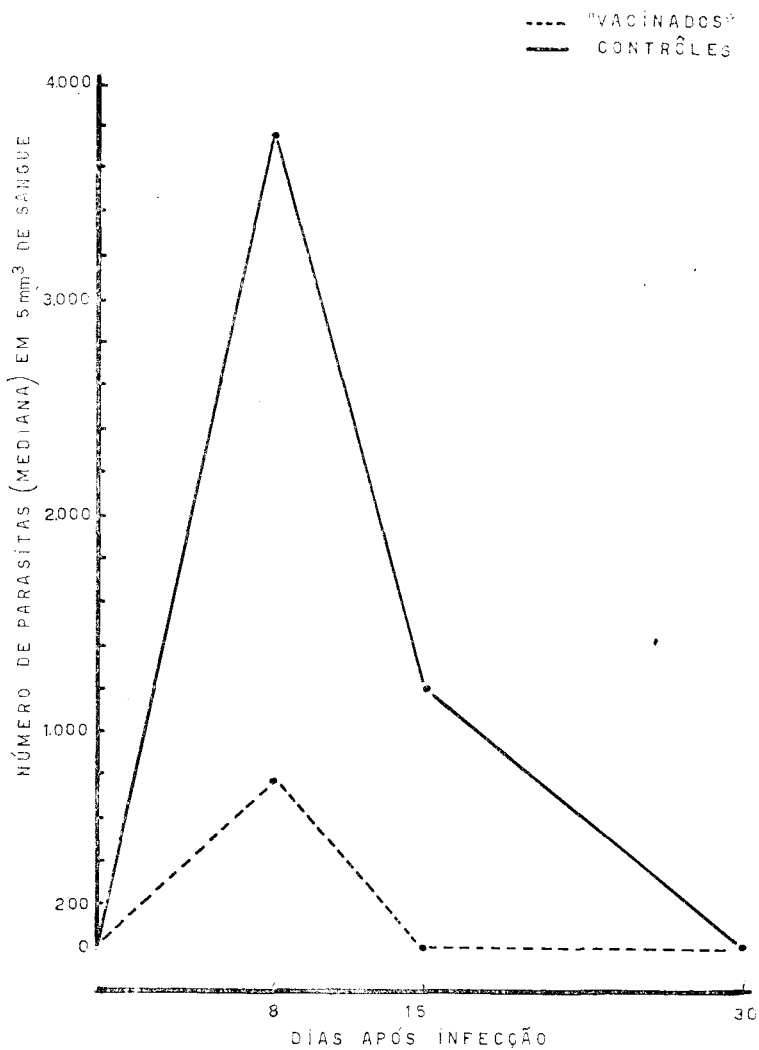


GRÁFICO II

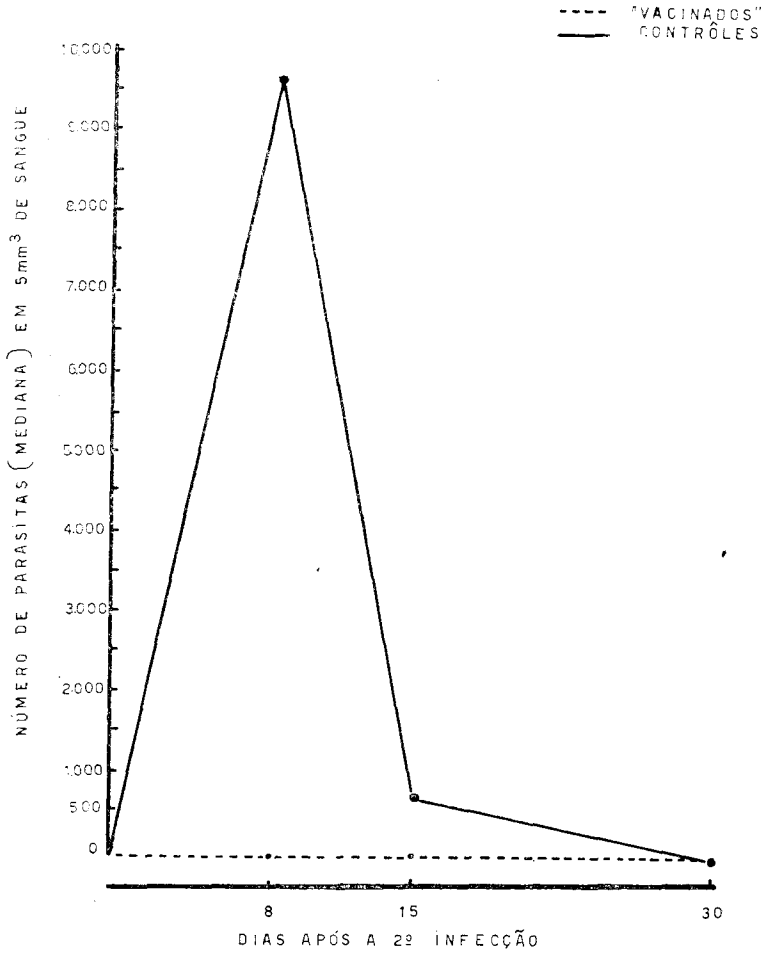


TABELA 2

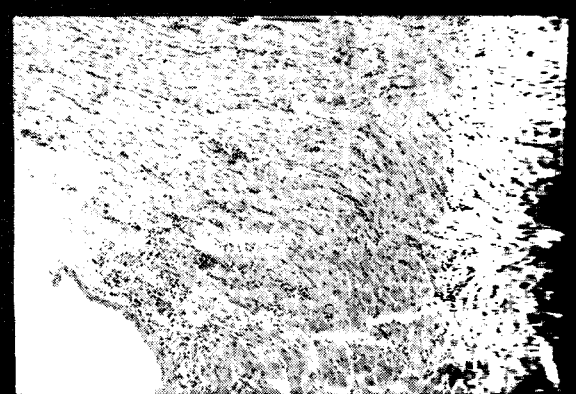
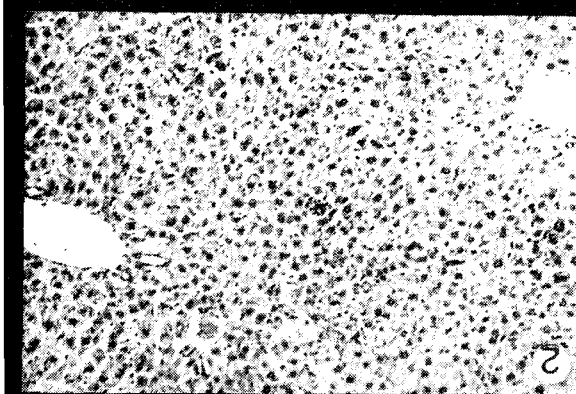
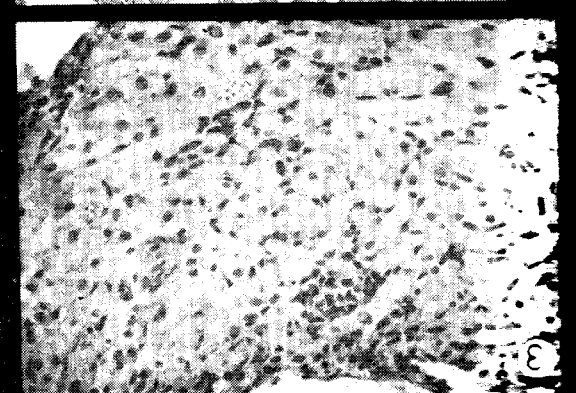
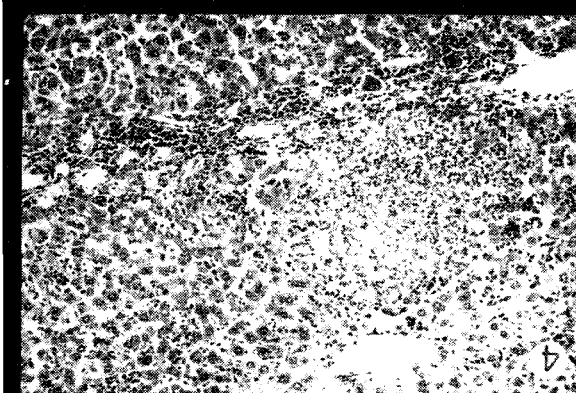
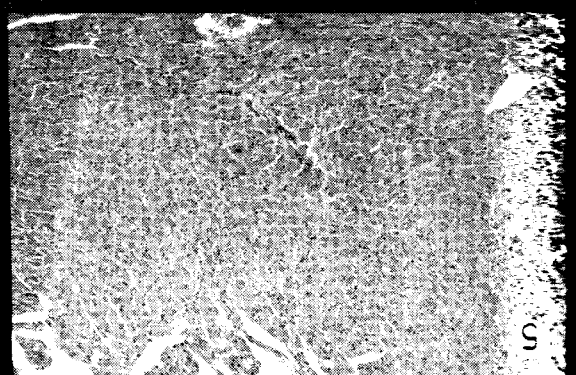
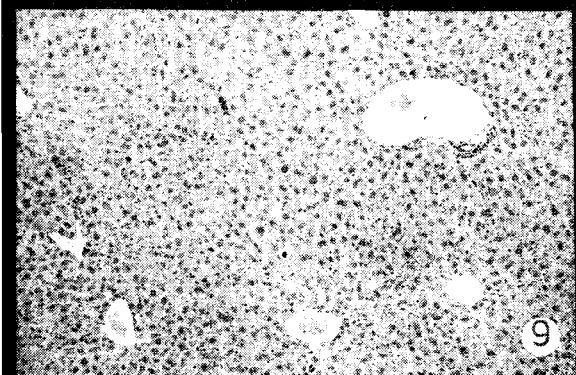
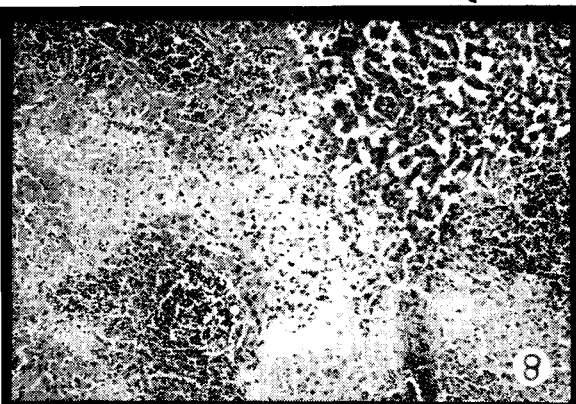
Camundongos vacinados e infectados duas vezes

	N.º	1. <sup>a</sup> Infecção Tempo após Vacinação	2. <sup>a</sup> Infecção Tempo após a 1. <sup>a</sup>	N.º parasitas/5mm <sup>3</sup> sangue		
				Dias após reinfecção		
				8	15	30
VACINADOS	1	4 semanas	15 semanas	0	0	0
	2	..	..	0	0	0
	3	..	..	0	0	0
	4	..	..	0	0	0
	5	..	..	0	0	0
	6	..	..	0	0	0
	7	..	..	0	0	0
	8	..	..	0	0	0
	MÉDIA				0	0
MEDIANA				0	0	0
CONTRÓLES	1	—	—	21.455	—	—
	2	—	—	15.645	630	0
	3	—	—	6.685	525	0
	4	—	—	20.475	805	0
	5	—	—	11.200	1.330	0
	6	—	—	6.090	945	0
	7	—	—	8.190	735	0
	8	—	—	6.020	630	0
	MÉDIA				11.970	800
MEDIANA				9.695	735	0

## SUMMARY

Mice immunized with a single dose of live "vaccine" of avirulent *Trypanosoma cruzi* present a good protection against challenge until 20 weeks after the "vaccination".

This immunity is slighter than the obtained on the fourth week of "vaccination" and even more than that presented by animals challenged four weeks after immunization and reinfected 15 weeks latter.



- Fig. 1 - 1 — Animal Fr21/5 — Vacinado e infectado 1 vez. Base do ventriculo esquerdo. Focos de infiltração histio-*linfocitária*, sem parasitas. Original 100x.
- Fig. 1 - 2 — Mesmo animal. Fígado. Discretíssimos focos de infiltração histio-*linfocitária* no parênquima. Ausência de parasitas. Original 160x.
- Fig. 1 - 3 — Animal Fr21/4 — Contrôles — Parede de aurícula com pseudocistos. Original 400x.
- Fig. 1 - 4 — Mesmo animal. Fígado com grande infiltrado inflamatório-crônico e áreas de necrose. Original 160x.
- Fig. 1 - 5 — Animal Fr34/1 — Vacinado e infectado duas vezes. Parede do V. E. com raros e discretíssimos focos inflamatórios crônicos. Ausência de parasitas. Original 100x.
- Fig. 1 - 6 — Mesmo Animal. Fígado. Raros e pequenos acúmulos de histócitos e *linfócitos* no parênquima. Ausência de parasitas. Original 100x.
- Fig. 1 - 7 — Animal Fr34/7 — Contrôles — Grandes focos de inflamação crônica na base dos ventriculos e nas paredes auriculares. Foram vistos raros pseudocistos. Original 160x.
- Fig. 1 - 8 — Mesmo animal. Fígado. Amplas áreas de necrose com grande infiltrado inflamatório crônico. Não foram vistos parasitas. Original 160x.



## BIBLIOGRAFIA

1. BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese. Fac. Farm. Odont. Univ. Minas Gerais, Belo Horizonte, 1961.
2. MENEZES, H. — Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *T. cruzi* against experimental infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 10:1-4, 1968.
3. MENEZES, H. — Active immunization of dogs with a non virulent strain of *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. No prelo.
4. MENEZES, H. — Lesões histológicas em camundongos "vacinados" com uma cepa avirulenta do *T. cruzi*. Rev. Bras. Med., 25:160-165, 1968.
5. MENEZES, H. — Lesões histológicas do coração em cães "vacinados" com uma cepa avirulenta de *T. cruzi*. Rev. Brasil. Med., 26:281-283, 1969.