

IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM VACINA VIVA AVIRU- LENTA DE TRYPANOSOMA CRUZI.

V — Ensaio de novos esquemas de vacinação

Humberto Menezes *

Camundongos vacinados com uma, duas ou três vacinas vivas quando infectados apresentam melhor grau de imunização e menor reação inflamatória do que animais vacinados unicamente com uma, duas ou três doses de vacinas fenoladas mortas e igualmente infectados.

A combinação de vacinas vivas e mortas não melhorou em nada os resultados obtidos unicamente com as vacinas vivas.

Em um trabalho anterior (6) ensaiamos três esquemas de vacinação usando unicamente vacinas vivas.

Numa tentativa de introduzir doses de refôrço com vacinas mortas e com o objetivo de, mais uma vez, procurar estudar, do ponto de vista histopatológico, o fenômeno de hipersensibilidade, referido na tripanosomose cruzi experimental por outros autores (1, 3, 7, 8), realizamos uma série de experimentos que vão a seguir relatados.

MATERIAL E MÉTODOS

1.1 — *Vacinas vivas (V)*. Foram empregadas suspensões salinas de *T. cruzi*, cepa PF (1) com 14 a 27 dias de cultivo em meio difásico de Packchannian.

Essas suspensões tinham de 50 a 90% de formas móveis com mais ou menos 7% de formas metacíclicas.

A quantidade média de tripanosomas nessas várias vacinas foi de 16×10^6 por ml sendo injetado em cada animal, de cada vez, 0,2 ml, por via subcutânea.

As vacinas foram tôdas utilizadas imediatamente após o seu preparo.

1.2 — *Vacinas mortas (M)*. Consistiram de suspensões dos mesmos tripanosomas utilizados nas vacinas vivas com a diferença de que a suspensão final, em vez de ser feita em solução salina simples, foi feita em sol. salina fenolada a 10/00.

A cada animal foi injetado 0,2 ml, de cada vez, por via subcutânea.

1.3 — *Tripanosomas virulentos*. Foram empregadas formas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y, colhidas de camundongos no 8.º dia de infecção. O sangue foi colhido por punção cardíaca em sol. de citrato de sódio. Os animais infectados receberam por via peritoneal 5.000 tripanosomas/g de peso corporal.

1.4 — *Animais*. Foram utilizados 152 camundongos albinos, de uma mesma linhagem, todos do sexo masculino, com 25/30 dias de idade, no início das experiências, e peso médio de 10 g.

* U.S.P. Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, S. Paulo, Brasil.

Êsses animais foram divididos em 13 grupos, conforme descrição abaixo.

VI — Nove animais (1.4) foram vacinados por via subcutânea com uma única dose da vacina viva (1.1).

M1 — Foram utilizados 10 camundongos injetados uma única vez com uma vacina morta (1.2).

V2 — Um grupo de 10 animais (1.4) foi vacinado com duas doses de vacina viva (1.1) com intervalo de sete dias.

M2 — 10 camundongos (1.4) foram vacinados com duas doses de vacina morta (1.2), com intervalos de sete dias.

V1 M1 — Um grupo de 10 animais (1.4) foi vacinado com uma dose de vacina viva (1.1) e sete dias depois com uma outra de vacina morta (1.2).

V1 M2 — 16 camundongos (1.4) foram vacinados, com intervalo de sete dias, com uma dose de vacina viva (1.1) e duas de vacina morta (1.2).

V2 M1 — 17 animais (1.4) foram vacinados, a intervalos de sete dias, com duas doses de vacinas vivas (1.1) e uma de vacina morta (1.2).

V3 — Um grupo de 10 camundongos (1.4) foi vacinado, com intervalos de sete dias, com três doses de vacinas vivas (1.1).

M3 — 10 animais (1.4) foram vacinados com três doses de vacinas mortas (1.2), com intervalos de sete dias.

Todos os animais de todos os grupos tiveram pesquisa de tripanosomas no sangue periférico 8 dias após cada vacina.

30 dias depois da 1.^a vacina, foram todos infectados com tripanosomas virulentos (1.3).

Parasitemias, pela técnica de Pizzi-Brener (2) foram então realizadas 8, 15 e 30 dias depois da infecção.

Os animais sobreviventes foram sacrificados e exames histopatológicos foram realizados em fragmentos de fígado, baço, rim e coração.

Contrôles — Os grupos VI e M1 tiveram um grupo-contrôle de 10 camundongos.

Os grupos V2, M2 e VI M1 igualmente tiveram 10 animais contrôles.

Os grupos V1 M2 e V2 M1 tiveram 20 animais contrôles e os grupos V3 e M3, 10 camundongos.

Todos os animais tinham a mesma idade dos animais testes e no decurso da experiência foram mantidos com a mesma dieta e nas mesmas condições ambientais.

A infecção foi feita no mesmo dia, com a mesma cepa, a mesma dose e a mesma via utilizada para os animais testes (1.3).

Parasitemias foram também realizadas no 8.^o, 15.^o e 30.^o dia após a infecção, bem como exames histopatológicos de todos os animais que morreram e dos que foram sacrificados ao fim do 30.^o dia.

RESULTADOS

A análise das Tabelas 1, 2, 3 e 4 e dos gráficos I, II, III e IV mostra que na presente série de experimentos não houve diferenças significativas na parasitemia e no grau de mortalidade entre os 3 grupos que receberam unicamente vacinas vivas.

Nos grupos que receberam uma e duas vacinas ainda apareceram alguns casos positivos, 8 dias após a infecção, mas que não foram suficientes para alterar o valor da mediana das parasitemias do grupo.

Já no grupo que recebeu 3 doses de vacinas vivas a parasitemia foi negativa em todos os animais e em todas as determinações efetuadas.

Os animais que foram vacinados unicamente com vacinas fenoladas, mortas, mostraram poucas diferenças na parasitemia (exceto o grupo M3), com relação aos respectivos grupos contrôles e uma ligeira melhoria com respeito à mortalidade mas que, do ponto de vista prático, não deve ser considerada como alentadora.

O emprêgo combinado de vacinas vivas e mortas não parece ter trazido nenhuma vantagem sobre o emprêgo unicamente das vacinas vivas.

Do ponto de vista histopatológico não foram observadas diferenças apreciáveis nas reações tissulares entre os três grupos que só receberam vacinas vivas.

No miocárdio destes casos, o infiltrado histio-linfocitário foi observado predominantemente nas paredes auriculares e nas bases do ventrículo E, próximo à emergência dos grossos vasos (Fig. 1.1).

Esses infiltrados foram menos disseminados e de grau menos atuado do que nos

animais que receberam uma vacina viva e duas mortas (Fig. 1.3) que por sua vez apresentavam reações menos pronunciadas do que nos animais vacinados unicamente com vacinas mortas.

Em alguns destes últimos o processo inflamatório histio-linfocitário era mais difuso e mais intenso (Fig. 1.5) que nos animais contrôles (Fig. 1.7).

A reação esplênica foi mais ou menos semelhante. Nos animais vacinados unicamente com vacinas mortas os folículos eram menores e menos numerosos que nos demais casos.

Os centros foliculares eram relativamente pequenos com escassa atividade mitótica e fagocitária (Fig. 1.6). O número de plasmócitos na polpa vermelha era reduzido.

O baço dos animais que receberam uma dose de vacina viva e duas vacinas mortas exibiam folículos com centros reacionais maiores que os anteriores, com um anel

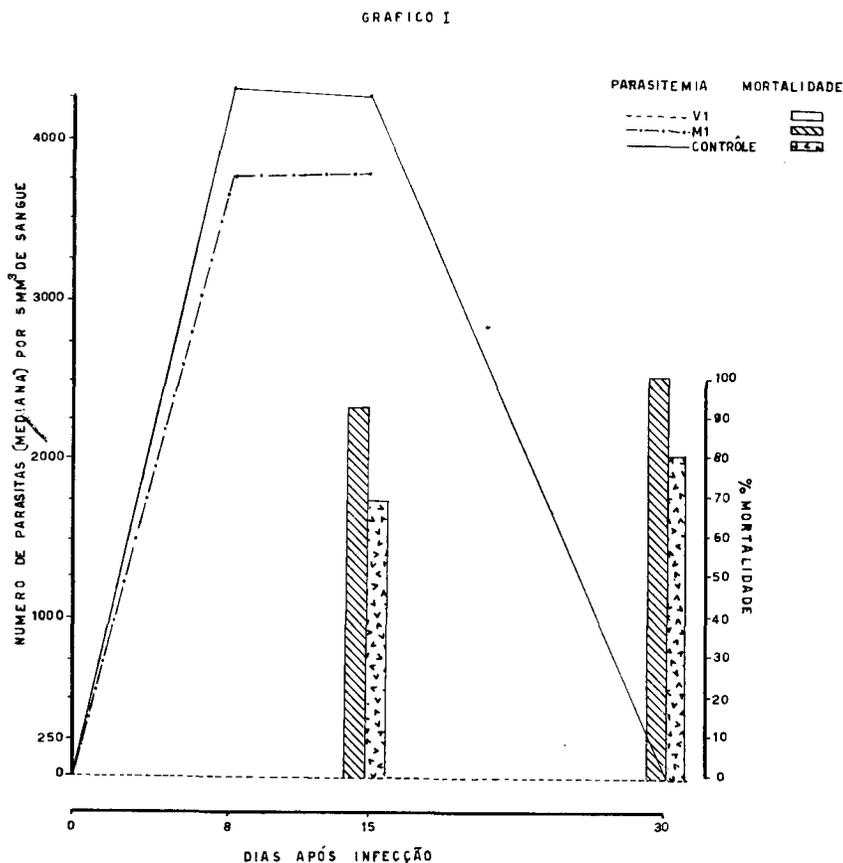


TABELA 1

ANIMAIS QUE RECEBERAM UMA ÚNICA VACINA VIVA (V_1) E UMA ÚNICA VACINA MORTA (M_1)

Grupo	N.º	N.º de parasitas por 5mm ³ de sangue			Morte
		8.º dia pós Infecção	15.º dia pós Infecção	30.º dia pós Infecção	Dias pós Infecção
V_1	1	35	—	—	
"	2	—	—	—	
"	3	35	—	—	
"	4	—	—	—	
"	5	—	—	—	
"	6	35	—	—	
"	7	—	—	—	
"	8	—	—	—	
"	9	35	—	—	
Mediana		0	0	0	
% Mortalidade		0	0	0	
M_1	1	3.580	x	x	12.º
"	2	2.975	x	x	13.º
"	3	7.700	3.675	x	17.º
"	4	3.325	x	x	14.º
"	5	3.850	x	x	14.º
"	6	3.570	x	x	13.º
"	7	3.430	x	x	14.º
"	8	4.025	x	x	15.º
"	9	4.975	x	x	15.º
"	10	5.250	x	x	15.º
Mediana		3.715	3.675		
% Mortalidade		0	90	100	
Contrôle	1	4.375	x	x	13.º
"	2	3.675	x	x	12.º
"	3	4.375	2.800	—	
"	4	3.570	x	x	14.º
"	5	10.500	x	x	14.º
"	6	4.375	x	x	15.º
"	7	4.025	4.200	x	16.º
"	8	4.200	3.675	—	
"	9	7.000	x	x	14.º
"	10	4.025	x	x	12.º
Mediana		4.287	4.200	0	
% Mortalidade		0	70	80	

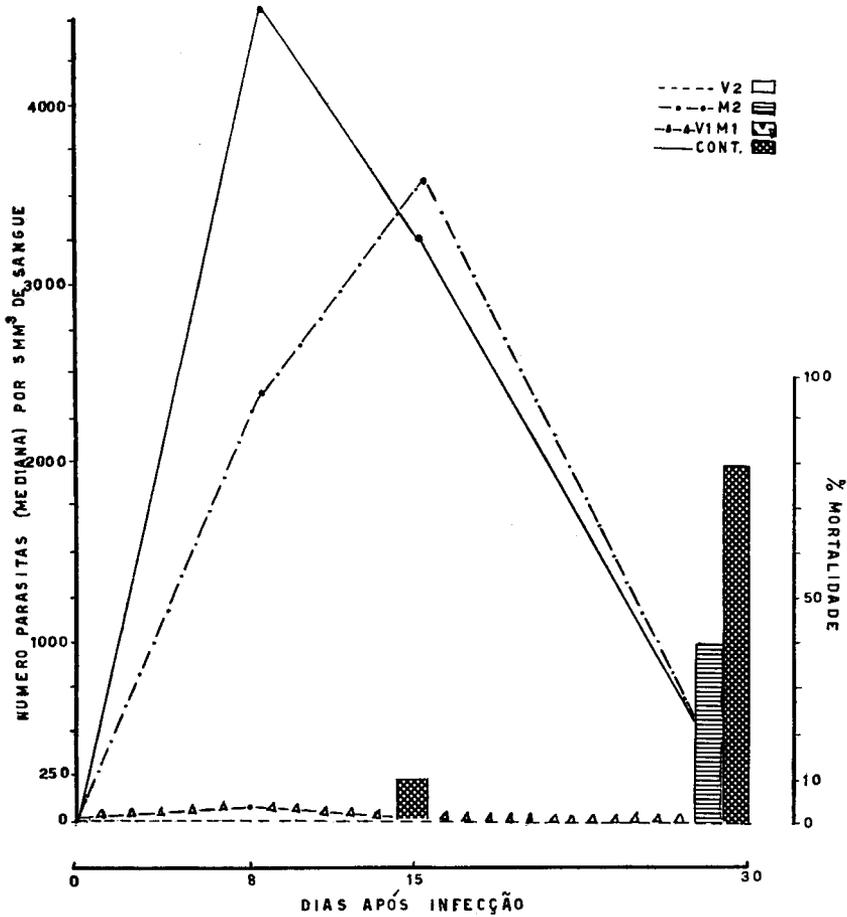
TABELA 2

ANIMAIS QUE RECEBERAM DUAS DOSES DE VACINAS VIVAS (V_2), DUAS DOSES DE VACINAS MORTAS (M_2) E UMA DOSE DE VACINA VIVA E OUTRA DE VACINA MORTA ($V_1 M_1$).

Grupo	N.º	N.º de parasitas por 5mm ³ de sangue			Morte
		8.º dia pós Infecção	15.º dia pós Infecção	30.º dia pós Infecção	Dias pós Infecção
V_2	1	—	—	—	
	2	—	—	—	
	3	35	—	—	
	4	—	—	—	
	5	—	—	—	
	6	35	—	—	
	7	35	—	—	
	8	35	—	—	
	9	—	—	—	
	10	—	—	—	
Mediana		0	0	0	
% Mortalidade		0	0	0	
M_2	1	2.170	5.250	x	17.º
	2	2.490	2.170	—	
	3	2.530	4.025	x	19.º
	4	2.170	4.375	70	
	5	2.490	2.730	35	
	6	2.835	3.570	—	
	7	2.030	1.680	x	27.º
	8	1.680	3.675	—	
	9	2.835	3.690	x	23.º
	10	1.505	3.290	—	
Mediana		2.330	3.622	0	
% Mortalidade		0	0	40	
$V_1 M_1$	1	70	—	—	
	2	—	—	—	
	3	105	—	—	
	4	—	—	—	
	5	35	—	—	
	6	—	—	—	
	8	—	—	—	
	7	35	—	—	
	9	35	—	—	
	10	—	—	—	
Mediana		17,5	0	0	
% Mortalidade		0	0	0	
Contrôle	1	10.500	3.015	x	17.º
	2	7.175	3.290	105	
	3	4.375	2.870	x	15.º
	4	5.250	x	x	11.º
	5	4.200	2.660	x	18.º
	6	4.025	2.590	x	16.º
	7	3.780	3.675	x	15.º
	8	3.830	3.780	—	
	9	4.550	4.375	x	27.º
	10	7.875	5.250	x	15.º
Mediana		4.462	3.290	53,5	
% Mortalidade		0	10	80	

Grupo	N.º	N.º de parasitas por 5mm ³ de sangue			Morte
		8.º dia pós Infecção	15.º dia pós Infecção	30.º dia pós Infecção	Dias pós Infecção
V ₁ M ₂	1	—	—	—	
	2	35	—	—	
	3	70	x	x	10.º
	4	—	—	—	
	5	35	x	x	10.º
	6	—	—	—	
	7	—	—	x	27.º
	8	70	—	x	20.º
	9	—	—	—	
	10	—	—	—	
	11	x	x	x	8.º
	12	35	—	x	20.º
	13	—	—	—	
	14	—	35	—	
	15	—	—	—	
	16	35	35	—	
Mediana		0	0	0	
% Mortalidade		6,2	18,7	37	
V ₂ M ₁	1	—	—	—	
	2	—	—	—	
	3	—	—	—	
	4	—	—	—	
	5	—	—	—	
	6	—	—	—	
	7	—	—	—	
	8	—	—	—	
	9	—	—	—	
	10	—	—	—	
	11	35	—	—	
	12	35	—	—	
	13	—	—	x	27.º
	14	35	x	x	13.º
	15	—	—	—	
	16	35	—	—	
	17	x	x	x	8.º
Mediana		0	0	0	
% Mortalidade		5,8	11,7	17,6	
Contrôle	1	3.500	2.310	—	
	2	2.920	x	x	13.º
	3	3.455	x	x	13.º
	4	2.135	2.275	x	17.º
	5	2.380	3.395	x	23.º
	6	2.520	x	x	14.º
	7	2.830	2.830	35	
	8	2.975	3.780	x	16.º
	9	2.660	x	x	11.º
	10	2.240	x	x	14.º
	11	17.500	x	x	13.º
	12	4.375	2.975	x	18.º
	13	14.000	3.675	x	18.º
	14	7.070	x	x	15.º
	15	3.780	x	x	13.º
	16	3.605	3.605	x	22.º
	17	28.000	x	x	13.º
	18	10.500	4.025	x	17.º
	19	3.570	2.660	x	26.º
	20	4.550	x	x	15.º
Mediana		3.535	3.185	17,5	
% Mortalidade		0	50	90	

GRAFICO II



linfocitário, peri-folicular, mais delgado que no caso anterior (Fig. 1.4). Na polpa vermelha se observavam grandes acúmulos de células plasmocitárias.

Uma fase mais avançada foi apresentada pelos baços dos animais contróles onde os folículos eram constituídos quase que exclusivamente pelos centros claros de Flemming onde era intensa a atividade fagocitária e mitótica das células de linhagem jovem (Fig. 1.8).

Finalmente, como expressão máxima de atividade hiperplásica linfóide e reticular encontramos os baços dos animais que receberam três doses de vacinas vivas.

Nestes, os folículos eram extremamente grandes, com grandes centros reacionais onde predominavam as células blásticas.

Era intensa, aí, a atividade fagocitária dos macrófagos e eram numerosas as figuras de mitose.

A coroa peri-folicular de pequenos linfócitos se mostrava extremamente delgada (Fig. 1.2).

Nos cordões medulares havia abundante quantidade de células plasmáticas.

Em nenhum dos animais examinados, qualquer que fôsse o grupo, foi possível evidenciar a existência de pseudo-cistos.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

A aparente discrepância observada entre as conclusões deste trabalho e aquelas a que chegamos em trabalho anterior (6)

TABELA 4

ANIMAIS VACINADOS COM TRÊS DOSES DE VACINAS VIVAS (V₃) E TRÊS DE VACINAS MORTAS (M₃).

Grupo	N.º	N.º de parasitas por 5mm ³ de sangue			Morte
		8.º dia pós Infecção	15.º dia pós Infecção	30.º dia pós Infecção	Dias pós Infecção
V ₃	1	—	—	—	
"	2	—	—	—	
"	3	—	—	—	
"	4	—	—	—	
"	5	—	—	—	
"	6	—	—	—	
"	7	—	—	—	
"	8	—	—	—	
"	9	—	—	—	
"	10	—	—	—	
Mediana		0	0	0	
% Mortalidade		0	0	0	
M ₃	1	4.900	5.250	x	17.º
"	2	4.375	3.675	x	23.º
"	3	3.570	3.080	—	
"	4	3.735	3.780	x	16.º
"	5	5.075	3.570	—	
"	6	7.000	3.255	—	
"	7	4.900	2.870	—	
"	8	4.550	2.730	x	15.º
"	9	3.675	3.675	x	18.º
"	10	4.235	3.670	x	23.º
Mediana		4.462	3.620	0	
% Mortalidade		0	0	60	
Contrôle	1	3.500	2.310	—	
"	2	2.920	x	x	13.º
"	3	3.455	x	x	13.º
"	4	2.135	2.275	x	17.º
"	5	2.380	3.395	x	23.º
"	6	2.520	x	x	14.º
"	7	2.380	2.830	35	
"	8	2.975	3.780	x	16.º
"	9	2.660	x	x	11.º
"	10	2.240	x	x	14.º
Mediana		2.590	2.830	17,5	
% Mortalidade		0	50	80	

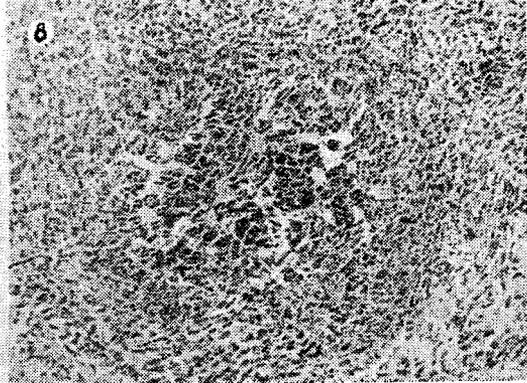
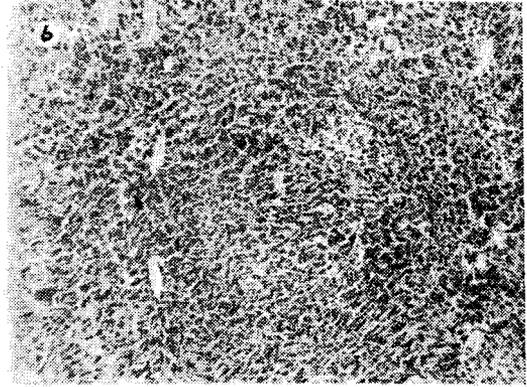
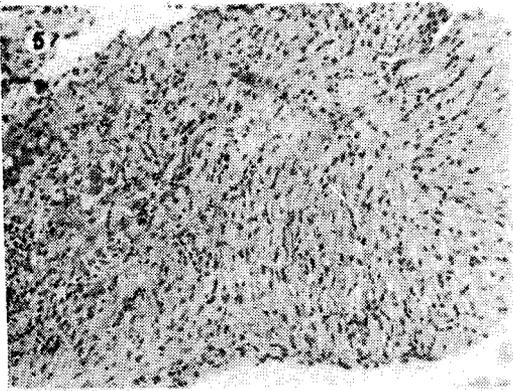
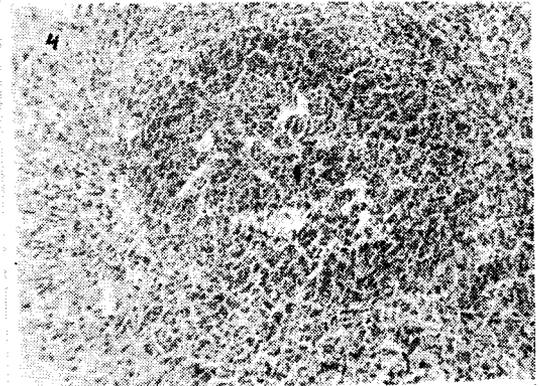
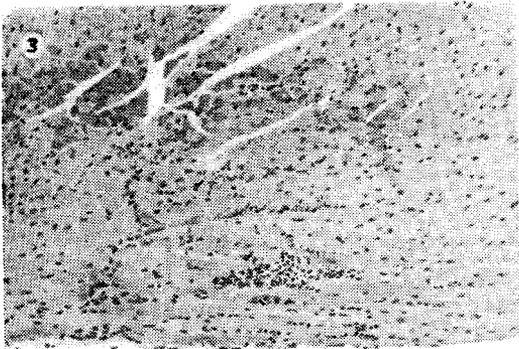
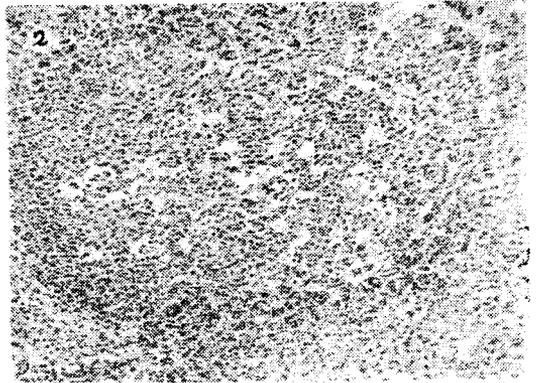
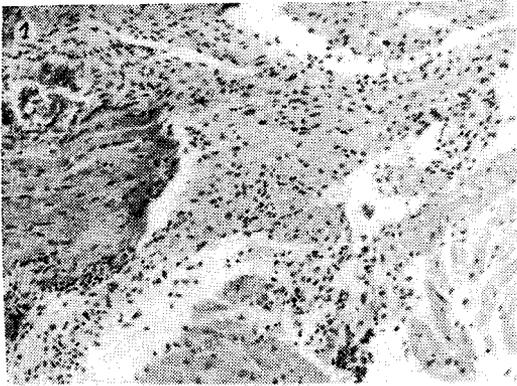


Fig. 1.1 — Discreto infiltrado histio-linfocitário na base do ventrículo esquerdo em animal vacinado com 3 doses de vacinas vivas (Fr 58 — 1 V3). Orig. 150 x

Fig. 1.2 — Baço do mesmo animal. Orig. 100 x.

Fig. 1.3 — Moderada infiltração histio-linfocitária nas paredes do ventrículo esquerdo em animal vacinado com uma vacina viva e duas mortas (Fr 58/3V1M2) Orig. 100 x.

Fig. 1.4 — Baço do mesmo animal. Orig. 100 x.

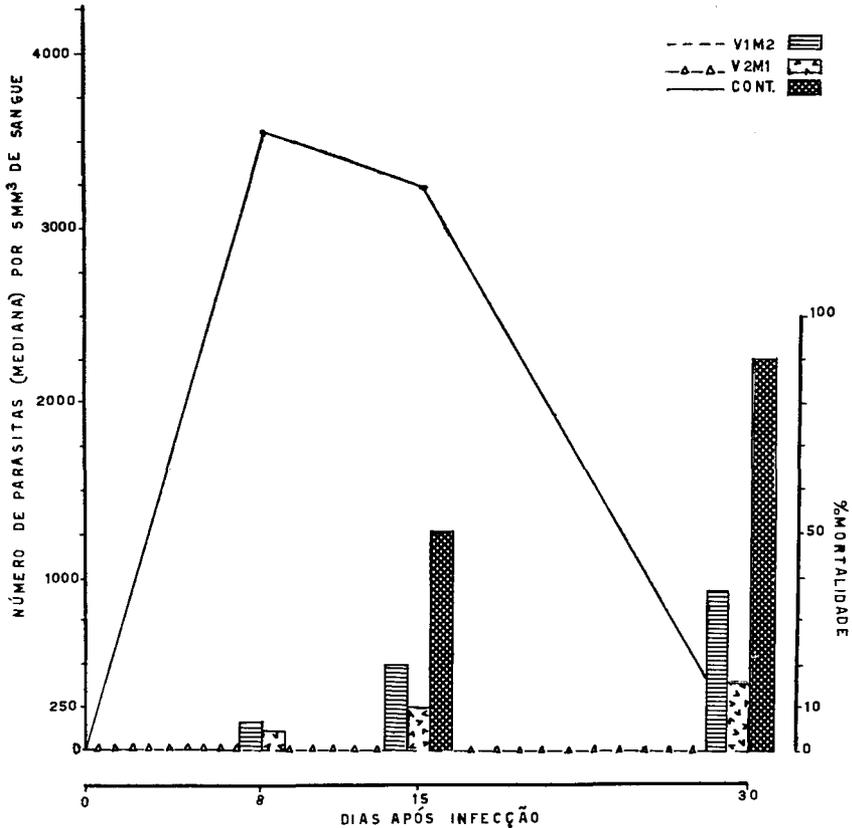
Fig. 1.5 — Infiltrado difuso histio-linfoplasmocitário em parede ventricular do coração do animal vacinado com 3 vacinas mortas (Fr 58/5-M3). Orig. 100 x.

Fig. 1.6 — Baço do mesmo animal. Orig. 100 x.

Fig. 1.7 — Infiltrado histio-linfocitário, difuso, no miocárdio do camundongo unicamente infectado. Orig. 120 x.

Fig. 1.8 — Baço do mesmo animal. Orig. 100 x.

GRAFICO III



com relação ao valor do emprêgo de uma ou mais doses de vacina se deve, seguramente, ao menor número de tripanosomas empregados, ao percentual de formas vivas e de formas metacíclicas que naquele foram menores do que nos experimentos atuais.

Nos animais vacinados unicamente com vacinas vivas, o exsudato inflamatório, no coração, foi sempre menos intenso do que o dos animais contrôles. O sistema histio-linfocitário dêstes últimos animais parece reagir mais intensamente do que o dos demais grupos, excetuado o dos camundongos que receberam unicamente vacinas vivas, onde os fenômenos hiperplásicos são os mais acentuados de todos.

Os camundongos vacinados com 3 vacinas mortas em geral apresentam exsuda-

ção inflamatória, no coração, de grau igual ou superior ao dos animais contrôles unicamente infectados.

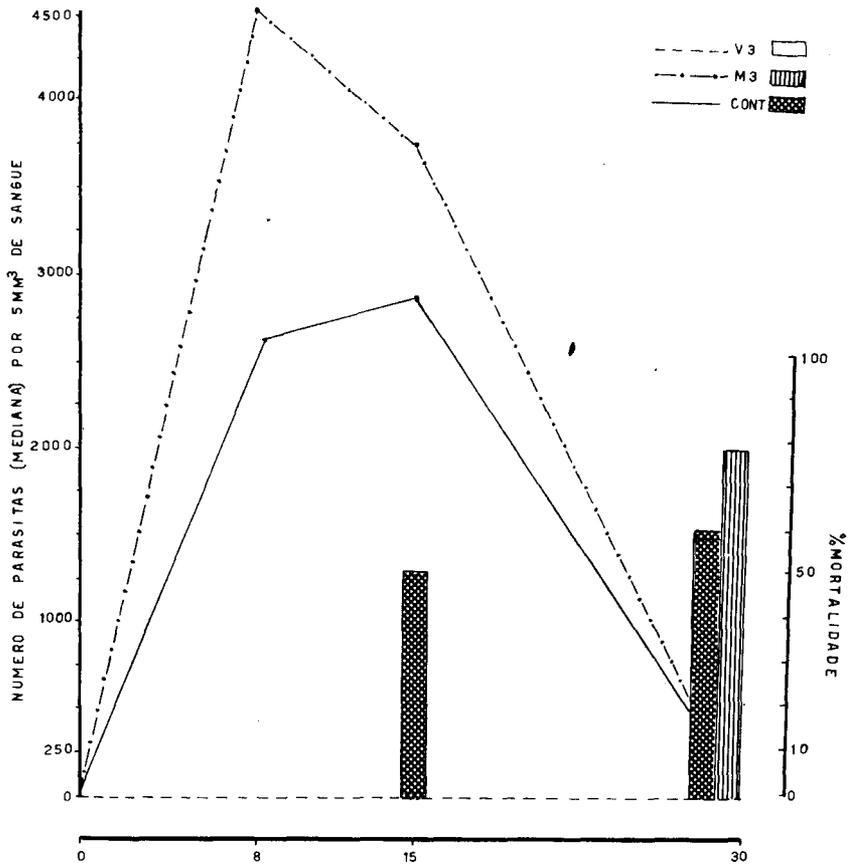
Este fato já foi mencionado por outros autores (1, 3, 7, 8), mesmo com vacinas vivas e interpretado como um certo grau de hipersensibilização, determinada pela vacina.

Em nossa experiência essa é a primeira vez que observamos êsse fenômeno e unicamente nos animais que receberam três doses de vacinas mortas fenoladas.

O exame da tabela 4 e do gráfico IV mostra que o grau da parasitemia dos animais dêsse grupo foi significativamente mais elevado do que o dos animais contrôles.

Do acima exposto pode-se concluir que

GRAFICO IV



a melhor proteção contra uma infecção experimental do camundongo por uma cepa virulenta do *T. cruzi*, é aquela obtida

por vacinas vivas avirulentas e que os animais imunizados com estas são os que oferecem menores reações inflamatórias.

SUMMARY

Mice vaccinated with one, two or three doses of a live avirulent vaccine of T. cruzi present better degree of resistance and slighter tissular inflammatory reaction, after challenge, than mice "vaccinated" with only one, two or three doses of killed phenolated vaccine of the same strain.

The combination of live and killed vaccines gives no better results than those obtained with the live vaccines only.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDRADE, S. G. & CARVALHO, M. L. — Efeito da excitação do sistema reticulo-endotelial pelo adjuvante de Freund na Doença de Chagas experimental. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 11: 229-235, 1969.
2. BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas. Tese. Fac. Farm. Odont. Univ. Minas Gerais. B. Horizonte, 1961.
3. FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, D. & OKUMURA, M. — Histopatologia do coração e músculos em camundongos imunizados contra *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 8: 151-156, 1956.
4. MENEZES, Humberto — Lesões histológicas em camundongos "vacinados" com uma cepa avirulenta do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Med. 25: 160-165, 1968.
5. MENEZES, Humberto — Lesões histológicas do coração em cães "vacinados" com uma cepa avirulenta de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Med. 26: 281-283, 1969.
6. MENEZES, Humberto — Imunização de camundongos com vacina viva avirulenta do *Trypanosoma cruzi*. IV — Ensaio de esquemas da vacinação. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 4: 1970.
7. MUNIZ, J. & AZEVEDO, A. P. — Novo conceito da patogenia da "Doença de Chagas" (Trypanosomiasis americana). Inflamação alérgica granulomatoide (A) e miocardite hiperérgica (B) produzidas em "Rhesus" (Macaca mullata) inoculada com formas mortas de cultivo do "*Schizotrypanum cruzi*". (Nota prévia). O Hospital, 32: 165-183, 1947.
8. TORRES, C. M. — Sobre a anatomia patológica da Doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 36: 391-404, 1941.