

REFRATARIEDADE DAS GALINHAS AO "TRYPANOSOMA (SCHIZOTRYPANUM) CRUZI" III — DISSOCIAÇÃO DOS FENÔMENOS DA REFRATARIEDADE E DA LISE DOS EPIMASTIGOTAS PELO SORO DAS AVES.¹

F. NERY-GUIMARÃES, ISMÉLIA VENÂNCIO E NOEMIA GRYNBERG*

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

SUMÁRIO: Há muito tempo é sabido serem as aves refratárias ao "*T. (S.) cruzi*". Em trabalhos anteriores verificou-se que nas galinhas pode-se obter infecções "in ovo" diagnosticáveis até o 21º dia de incubação, porém, logo após o nascimento os pintos mostram-se refratários ao parasito, que é destruído no ponto de inoculação. Neste trabalho verificou-se que tripomastigotas injetados diretamente no sangue, podem ser esporadicamente encontrados até 1 h depois. Verificou-se também que galinhas bursectomizadas, com associação de testosterona "in ovo" e ciclofosfamida nos 4 primeiros dias de vida permanecem refratárias. Entretanto, o soro dessas aves perde a capacidade lítica que o soro das aves normais possui para os epimastigotas do "*T. (S.) cruzi*", pela qual são responsáveis as gama-globulinas séricas, conforme foi verificado após o fracionamento do soro em coluna de DEAE-Sefádex A50. A dissociação dos 2 fenômenos, mostra que a capacidade lítica pode ser atribuída a um "anticorpo natural" — uma vez que é eliminada ou grandemente diminuída com a supressão do sistema imunitário bursa-dependente — porém, o mesmo não se pode concluir quanto à refratariedade. Esta, provavelmente, deve estar relacionada ao próprio metabolismo celular após o nascimento.

EM trabalhos anteriores (^{4, 5}) foi verificado que o "*T. (S.) cruzi*" (*cruzi*) injetado na pele das aves, há muito sabidas refratárias, é eliminado no ponto da inoculação, não atingindo, aparentemente, a corrente circulatória; que a refratariedade nas galinhas ocorre desde o nascimento e persiste após a bursectomia hormonal; e, finalmente, que nos ovos embrionados são obtidas infecções diagnosticáveis até o dia do nascimento, mas os pintos nas-

cidos dos mesmos grupos de ovos inoculados são sistematicamente refratários. Neste trabalho é relatado a rápida eliminação de tripomastigotas injetados diretamente no sangue das aves; a persistência da refratariedade mesmo quando a bursectomia hormonal é reforçada pela ciclofosfamida (²); e, finalmente, a dissociação dos fenômenos da refratariedade e da lise dos epimastogotas do *cruzi* pelo soro das galinhas.

1 — Recebido para publicação em 15 de maio de 1974.

Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz, realizado com ajuda do Conselho Nacional de Pesquisas.

* — Pesquisadores em Medicina e Biologia.

MATERIAL E MÉTODOS

a) *Ovos e pintos*. Foram usados ovos embrionados Leghorn e Pintos deles nascidos no Laboratório.

b) *Bursectomia*. Grupos de 60 ovos de 12 dias foram injetados na membrana cório-alantóide com 2,5 mg de testosterona* e os pintos foram injetados no peritônio com 2,0 mg de ciclofosfamida** nos 4 primeiros dias de vida. Esses pintos são referidos como TC. Dois grupos de aves normais receberam ciclofosfamida em altas doses: 10 pintos de 46 dias (pesando em média 450 g) receberam 10 mg/5 vezes/10 dias, e 10 frangos de 120 dias (pesando em média 860 g) receberam 20 mg/5 vezes/10 dias. Esses pintos são referidos como C.

c) "*Cruzi*". Foi utilizada a cepa Y: 1 ml de suspensões espessas de formas de cultivo em Brain Heart Infusion (Difco) contendo aproximadamente 5% de tripomastigotas metacíclicos ou 1 ml de suspensões de tripomastigotas sanguíneos obtidos por punção cardíaca de camundongos de 11 dias de infectados depois de lavados com salina e na dose de 3×10^5 por ml.

A inoculação do *cruzi* em pintos TC foi feita no peritônio aos 20 dias de vida, e esses pintos passaram a ser referidos como TCY. Os pintos C também receberam o *cruzi* no peritônio e passaram a ser referidos como CY. Dez pintos normais (de 5 dias) receberam tripomastigotas sanguíneos diretamente no sangue (veia do pescoço).

d) *Controle da refratariedade dos pintos TC e CY*. Do 6º ao 14º dia da inoculação do *cruzi*, os pintos foram sangrados na veia da asa em dias alternados (5 vezes) e o seu sangue foi injetado no peritônio de camundongos recém-nascidos indicadores (CRI) em grupos de 2 CRI cada vez para cada pinto. Do 5º ao 15º dia da inoculação foram feitas hemoscopias diárias dos CRI (sangue da ponta da cauda) os quais foram sacrificados no 20º dia. De cerca de metade dos CRI, coração, intestino, fígado

e baço eram fixados em formol a 10% e os cortes corados pela Hematoxilina-Eosina (H-E). Os pintos foram sacrificados entre os 20 e os 130 dias da inoculação do *cruzi*, fixando-se os seus órgãos da mesma maneira, e corando-se os cortes pela H-E — e pelo verde metila-pironina.

e) *Controle da eliminação dos tripomastigotas injetados diretamente no sangue*. Após a injeção, os pintos foram sacrificados, um a um, de 1/2 em 1/2 h, por sangria cardíaca total com seringa heparinizada. O sangue de cada um foi imediatamente injetado no peritônio em ninhadas de 8 CRI. O exame dos CRI foi feito como acima indicado.

f) *Controle da bursectomia*. Os efeitos da testosterona, já descritos⁽⁵⁾, foram um tanto agravados pela ciclofosfamida, sendo maior a letalidade dos pintos: 40 a 50% de mortes entre 6 a 20 dias de vida. Daí para diante a letalidade foi rara. Foram aumentados os cuidados para a desobstrução cloacal. Nos pintos TC mortos de intercorrência ou sacrificados até os 30 dias de vida (total de 39) foram pesquisados: resquícios de bursas no local da implantação bursal, anatômica e histologicamente, em material suspeito, após fixação, cortes e coloração (H-E); frequência de células pironinófilas nos folículos esplênicos; e comportamento das gama-globulinas do soro das aves pela eletroforese. Foi feito o acompanhamento eletroforético dos soros de 32 pintos normais, de 11 a 119 dias de vida; de 25 soros de pintos TC e TCY; e de 8 soros de pintos CY.

Os frangos que receberam doses elevadas de ciclofosfamida, apresentaram retardo ponderal e eriçamento de penas, mas resistiram à toxidez da droga.

g) *Provas de lise dos epimastigotas pelo soro das galinhas*. As provas foram feitas à temperatura ambiente. A 37°C a lise pareceu um tanto acelerada, foi abolida a 56°C-30 minutos, mas não mostrou aparentes alterações a 0º-4°C. Em 2 experiências verificou-se a sua diminuição ou eliminação pela adição de heparina aos tubos de prova nas doses de 50 a 200 UI e 200 a 800 UI, respectivamente.

* — Durateston (R). Lab. Organon do Brasil.

** — Enduxan (R). Lab. Pravaz Ricordati.

As provas foram feitas em tubos de hemólise estéreis, juntando-se 0,9 ml de soro de galinha diluído e 0,1 ml de suspensão em salina de cultivos do *cruzi*, contendo aproximadamente 3×10^6 parasitos p.ml. Em cada prova, um tubo testemunha (T) continha salina e suspensão de parasitos nas proporções indicadas. No cômputo das provas foram considerados apenas a diluição 1:2 e o tempo limite de 2h. Não foram contados os parasitos. Microscopando uma gota de cada tubo entre lâmina e lamínula, (Oc.10X.Obj.20X) foi estabelecida a seguinte leitura convencional:

- 0 = Ausência de lise (Aspecto semelhante ao T)
- 1 + = Lise parcial (Sensível diminuição do nº de epimastigotas móveis)
- 2 + = Lise total (Ausência de epimastigotas móveis)

Ao contrário dos epimastigotas, os tripomastigotas apresentam grande resistência à ação do soro das galinhas, encontrando-se muitos vivos até depois de 24h de incubação.

Foi estudada a capacidade lítica para os epimastigotas do *cruzi* dos soros de 51 pintos normais; 18 pintos TC; 19 pintos TCY; e 20 pintos CY.

h) *Fracionamento do soro de galinhas normais.* Na tentativa de definir a fração ou frações responsáveis pela lise foram feitas experiências preliminares de fracionamento do soro de galinhas por cromatografia em coluna (2,8X12 cm) de DEAE-Sefadex-A50 (Farmácia, Uppsala). Foram colocados cuidadosamente na coluna 5 a 10 ml de soro; e foi utilizado um sistema tampão fosfato 0,02 M pH 6,6 com concentração crescente de NaCl: 0,07 M; 0,2M; 0,17 M; e 0,38 M. As frações protéicas obtidas foram liofilizadas e dializadas contra solução fisiológica. Após a dosagem de proteínas pelo método de Lowry & al (1951) os frações foram analisadas por eletroforese em papel. De acordo com a concentração salina usada, os picos mostraram características diferentes: A fração I não pôde ser caracterizada por causa de sua

grande labilidade; a fração II mostrou-se constituída principalmente por gama-globulina; a fração III era constituída por uma mistura de globulinas e albumina; e, finalmente, a fração IV era constituída principalmente por albumina.

RESULTADOS

Bursectomia. Em 4 pintos bursectomizados, de 39 examinados, foram vistos nódulos esbranquiçados suspeitos de resquícios de bursas no ponto de implantação bursal, encontrando-se histologicamente em um deles, estrutura epitelial bursóide sem formação de folículos. Nos cortes de baço (comparados com os baços de pintos normais) foi constatada pobreza de células pironinófilas nos folículos linfóides nas aves bursectomizadas. Nestas, era também nítida a diminuição, ou o desaparecimento das gama-globulinas, de acordo com os perfis eletroforéticos dos seus soros. Enquanto nos soros de pintos normais e de pintos CY foi constatada a presença regular de gama-globulinas nos soros de pintos TC e TCY foi observada nítida repressão no percentual das gama-globulinas.

Foram encontrados focos de miocardite e hepatite nos pintos CY, atribuídos a patógenos pré-existentes, exaltados pela quebra das defesas orgânicas das aves pela ação das doses elevadas da ciclofosfamida.

Refratariedade. Tanto os pintos TCY inoculados com cultivos ou com tripomastigotas sangüíneos, como os pintos CY inoculados com tripomastigotas sangüíneos permaneceram refratários ao *cruzi*. Em todas as experiências o exame dos CRI (total de 554) foi negativo nas hemoscopias para tripomastigotas; e, nas histoscopias, 330 CRI também foram negativos para amastigotas. A histoscopia dos órgãos dos pintos (total de 59) também foi negativa. Quadro I. (Cinco pintos e 56 CRI morreram de intercorrência antes de completar o esquema de exame). A técnica de controle da parasitemia pelo uso dos CRI mostrou-se mais eficiente que o xenodiagnóstico e a tentativa de cultivos em experiências anteriores⁴.

Eliminação dos tripomastigotas sangüíneos injetados diretamente no sangue. Dos 10 pintos normais usados nas experiências, apenas um deu resultado positivo em um CRI inoculado no período de 1h.

Prova de lise. Verificou-se que 66,7% dos soros de pintos normais de 2 a 40 dias, mostraram 1+ (e um pinto 2+); e 93,0% dos soros de pintos normais de 42 a 119 dias, mostraram 2+ (e um pinto 1+). Por outro lado, 88,9% dos soros de pintos TC e 78,9% dos soros dos pintos TCY perderam a capacidade lítica. Entretanto, 100% dos

pintos CY mantiveram a capacidade lítica total (2+) ou parcial (1+) Quadro II.

Provas de lise com frações do soro de galinhas normais. As frações obtidas foram testadas quanto à sua capacidade lítica para os epimastigotas do *cruzi*. Verificou-se que a mais ativa era a fração II constituída, como vimos por gama-globulinas; a fração III (uma mistura de globulinas e albumina) mostrou atividade lítica de pouca intensidade; e, finalmente a fração IV constituída principalmente de albumina, não mostrou nenhuma ação lítica.

QUADRO I

Refratariedade de pintos TCY e CY** ao "T. (S.) cruzi" (Cepa Y) comprovada pela inoculação do seu sangue em camundongos recém-nascidos indicadores (CRI)*

Pintos	Nº de inoculados	Material inoculado (peritônio)	CRI (examinados e negativos)	
			hemoscopia	histoscopia
TCY	22	cultivos	191	114
TCY	22	tripomastigotas sangüíneos	186	109
CY	20	tripomastigotas sangüíneos	177	107
Totais	64	—	554	330

TCY* — Bursectomizados e inoculados com *T. (S.) cruzi*.

CY** — Tratados com ciclofosfamida e inoculados com *T. (S.) cruzi*.

QUADRO II

Capacidade lítica (em 2h) para epimastigotas do "T (S) cruzi" (Cepa Y) do soro (a 1:2) de pintos normais, CY, TC** e TCY****

Pintos	Idade (dias) / Nº	Resultados das provas de Lise		
		Ausência	Lise parcial	Lise total
Normais	2 a 40/18	5 (27,3%)	12 (66,7%)	1
	42 a 80/33	0	1	32 (97,0%)
CY	46 a 120/20	0	6 (30%)	14 (70%)
TC	10 a 100/18	16 (88,9%)	2	0
TCY	28 a 122/19	15 (78,9%)	3	1

CY* — Tratados com ciclofosfamida e inoculados com «*T.(S.) cruzi*».

TC** — Bursectomizados.

TCY*** — Bursectomizados e inoculados com «*T.(S.) cruzi*».

DISCUSSÃO

Já tinha sido verificado que os parasitos injetados na pele das aves eram aí eliminados não atingindo, aparentemente, a corrente circulatória (4). Em complementação, constatou-se neste trabalho que injetados diretamente no sangue eles só podem ser encontrados, esporadicamente, até 1h depois. Entretanto, como os tripomastigotas resistem até 24hs à ação do soro das aves (que elimina rapidamente os epimastigotas) a causa da eliminação dos tripomastigotas do sangue deve ser diferente.

Confirmou-se que a refratariedade das aves ao *cruzi* persiste após a bursectomia, assegurada com a associação da ciclofosfamida, logo após o nascimento, com testosterona "in ovo" (2). O citostático tem um efeito semelhante à irradiação-X subletal após a bursectomia na vida embrionária (LERMAN & WEIDANZ, 1970) (2), isto é, seriam eliminadas células destinadas à linhagem plasmática que teriam escapado para a corrente circulatória e para os centros linfóides periféricos, antes da bursectomia. Essas células é que seriam responsáveis pela falta de uniformidade dos resultados da bursectomia, no que diz respeito à supressão do sistema imunitário bursa-dependente.

Neste trabalho, o êxito da bursectomia foi demonstrado: anatômica e histologicamente; pela diminuição ou eliminação das gama-globulinas séricas; pela diminuição de células pironinófilas nos folículos linfáticos periféricos; e, finalmente, pela eliminação ou grande diminuição da capacidade lítica dos soros das aves para os epimastigotas do *cruzi*.

A capacidade lítica do soro das galinhas para os epimastigotas do *cruzi* ocorre desde o nascimento. Nos primeiros dias de vida ela pode diminuir ou desaparecer, mas aumenta com a idade, consolidando-se aparentemente depois dos 40 dias de vida, justamente com o amadurecimento bursal. Essa ação lítica, que fora atribuída ao complemento (6), foi atribuída por WARREN & BORSOS, 1959 (7) a 2 fatores: um fator aglutinante termoestável e um fator lítico termolábil, que seria o complemento. Estes autores concluem que as aves podem produzir anticorpos contra uma substância idêntica ou estreitamente relacionada à dieta, ou mais provavelmente a um microrganismo contaminante. Reações cruzadas ocorrem entre bactérias e protozoários, inclusive o *cruzi*. (Bibliografia in Felsenfeld & Wolf, 1972 (1)).

A hipótese "anticorpal" da ação lítica tem apoio no seu decréscimo ou eliminação pela bursectomia, conforme ficou demonstrado neste trabalho. E tanto mais que, como também foi demonstrado, a capacidade lítica reside principalmente na fração gama-globulina do soro.

Todavia, apesar da eliminação da capacidade lítica dos seus soros para os epimastigotas do *cruzi*, as aves continuaram refratárias a este parasito. Então, parece evidente que a capacidade lítica do soro das galinhas para os epimastigotas do *cruzi* e a refratariedade das aves a este parasito, são 2 fenômenos distintos. A capacidade lítica deve então ser atribuída a um "anticorpo natural". O mesmo, no entanto, não poderia ser atribuído ao fenômeno da refratariedade. Esta talvez, esteja relacionada ao próprio metabolismo celular depois do nascimento.

SUMMARY

The refractory state of birds towards the "Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi". III — The dissociation of the phenomena of the refractory state and the lysis of the epimastigotes by chicken sera.

The refractory state of birds to the "*T (S) cruzi*" is well known since long ago. In previous papers it was possible to observe in chicks, infection "in ovo", still present at the last day of incubation. Nevertheless after hatching the chicks become refractory to the parasite. The destruction of the parasites takes place in the skin at the inoculation point. Throughout these studies the authors verified that the trypomastigotes forms disappear within an hour, after being injected directly into the blood stream. Bur-

sectomized chicks by treatment with testosterone "in ovo" plus cyclophosphamide in the first four days of life, show also the refractory condition, but their sera lack the lytic capacity to the epimastigotes of "*T. (S.) cruzi*", which is peculiar to normal chicken sera. Fractionation of chicken sera in column of DEAE Sephadex-A50 led to the conclusion that the gammaglobulins are the principal responsible for these lytic capacity. The dissociation of the two phenomena shows that the lytic capacity must be attributed to a "natural antibody" — since it is eliminated or become greatly reduced by depression of the immunity bursa-dependent system. Regarding to the refractory condition, the same conclusion cannot be drawn. Perhaps it is related to cellular metabolism after the process of hatching.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — FERSENFELD, O. & WOLF, R. H., 1973, Interference between borreliae and trypanosomes. I — Antigenic analysis, fluorescent antibody and immobilisine studies of *Borrelia turicatae* and *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 67:251.
- 2 — LERMAN, S. P. & WEIDANZ, W. P., 1970, The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral response in chickens. *J. Immunol.* 105:614.
- 3 — LOWRY, O. H. ROSENBROUG, N. I., LEWIS FARR, A. & RANDALL, R., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- 4 — NERY-GUIMARÃES, F., 1972, Refratariedade das aves ao *Trypanosoma (S.) cruzi* I. Ausência de passagens dos parasitos para o sangue; duração da viabilidade e destruição dos parasitos na pele. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 70:39.
- 5 — & LAGE, H. A., 1972, A refratariedade das aves ao *T. (S.) cruzi* II. Refratariedade das galinhas desde o nascimento; persistência da refratariedade após bursectomia; infecções em ovos embrionados. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 70:97.
- 6 — RUBIO, M., 1956, Lytic effect of normal sera upon blood and culture stages of *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Chil. Parasitol.* 11:62.
- 7 — WARREN, L. G. & BORSOS, T., 1959, Studies on immune factors occurring in sera of chickens against the tritidia stage of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 82:585.