

IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM «VACINA» VIVA AVIRULENTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

I — Ensaio da avaliação do menor inoculo eficiente.

Humberto Menezes *

O Autor procura verificar qual o menor número de Trypanosoma cruzi, da cepa Y avirulenta, capaz de conferir a camundongos imunidade eficiente contra uma ulterior infecção com a cepa Y virulenta do mesmo parasita.

Considerações gerais sôbre o possível mecanismo da imunização são esboçadas.

Em trabalhos anteriores procuramos demonstrar o efeito protetor de uma cepa avirulenta do *Trypanosoma cruzi* contra infecção experimental com cepa altamente virulenta do mesmo flagelado (7, 11, 13)

Naqueles trabalhos foi utilizado, deliberadamente, um inóculo muito grande, pois o objetivo era duplo: mostrar o papel imunizante da vacina usada e ao mesmo tempo a sua avirulência.

Visando uma possível aplicação prática posterior procuramos avaliar a quantidade mínima de tripanosomas avirulentos capaz de proteger eficientemente camundongos contra uma infecção virulenta.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos como "vacina" uma cultura de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, mantida em meio de cultura de Packchanian (sub-inoculação n.º 306 do Departamento de Parasitologia da F.M.R.P.), com 28 dias de idade.

O líquido de condensação do meio foi centrifugado e o sedimento suspenso em solução salina, centrifugado várias vezes,

à baixa rotação, até se obter um sobrenadante límpido.

O sedimento foi mais uma vez suspenso em solução salina, tendo sido feita imediatamente uma avaliação do número de formas vivas presentes, calculando-se estas em cerca de 60% de todos os parasitas.

Deixou-se secar uma gota de "vacina" sôbre uma lâmina e posteriormente procedeu-se a uma coloração pelo Giemsa.

Com o auxílio de uma ocular integradora Zeiss e tendo como padrão um esfregaço de sangue cujo número de hemácias por mm³ era conhecido, procedeu-se à estimativa do número de parasitas por ml.

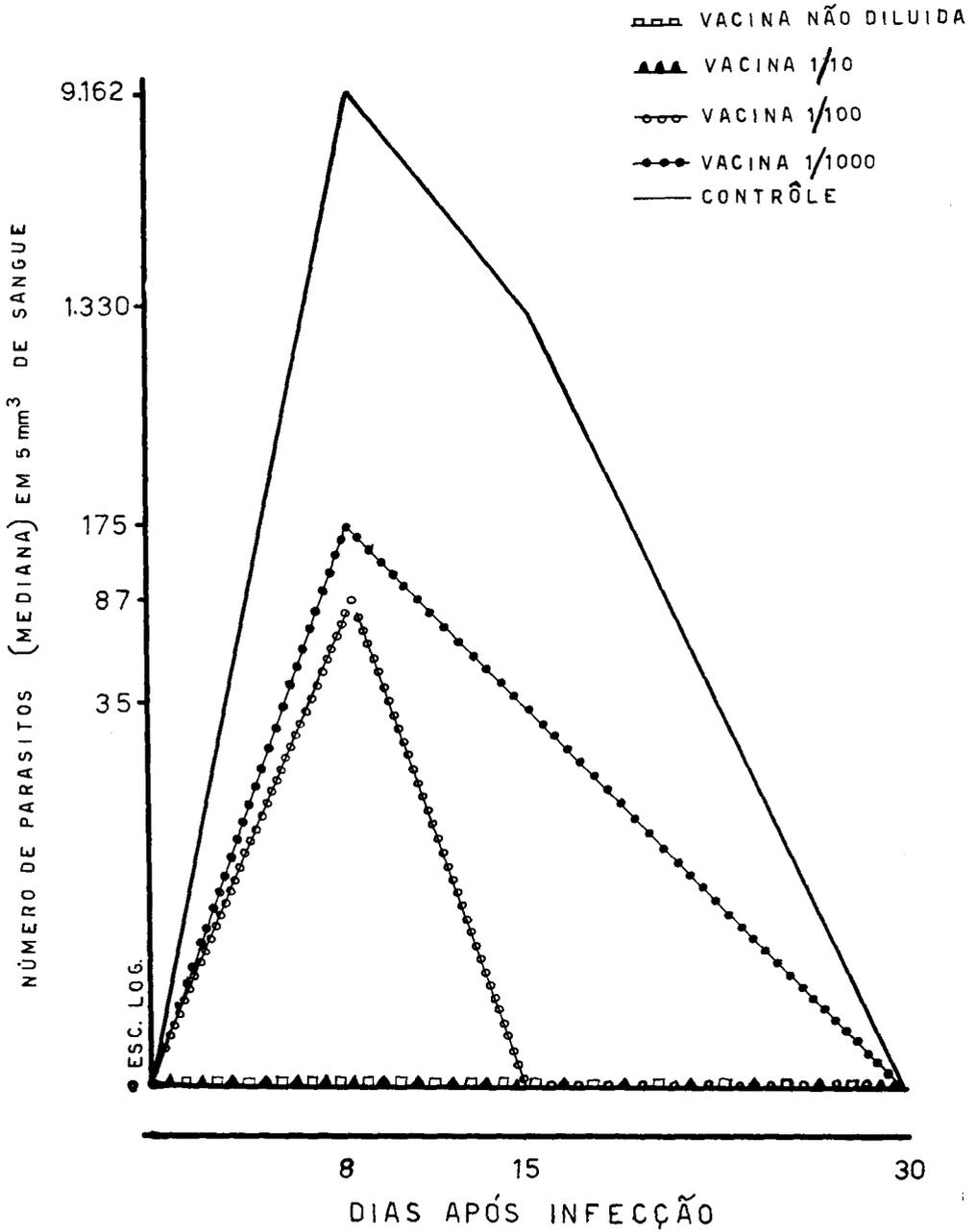
A mesma lâmina examinada com imersão permitiu avaliar o percentual de formas metacíclicas.

Dêsse modo calculou-se que 1 ml da vacina possuía: 2,4x 10⁶ parasitas dos quais 60% estavam vivos. As formas metacíclicas correspondiam mais ou menos a 10% dos tripanosomas presentes na preparação.

A "vacina" foi então dividida em quatro frações sendo não diluída a primeira e as demais diluídas a 1/10, 1/100 e 1/1000, sucessivamente.

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

GRAFICO Nº 1



Vacina	Camundongo N.º	Número parasitas/5mm ³ de sangue		
		Dias após a		Infecção
		8	15	
Não diluída	1	0	70	0
	2	105	175	0
	3	0	0	0
	4	0	35	0
	5	1330	175	0
	6	35	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
	9	385	0	0
	10	0	0	0
	Média	185	45	0
	Mediana	0	0	0
1/10	1	0	35	0
	2	140	0	0
	3	105	0	0
	4	0	35	0
	5	0	35	0
	6	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
	9	0	0	0
	10	210	0	0
	Média	45	10	0
	Mediana	0	0	0
1/100	1	70	0	0
	2	70	0	0
	3	140	70	0
	4	105	35	0
	5	185	0	0
	6	70	35	0
	7	175	0	0
	8	0	0	0
	9	105	0	0
	10	70	70	0
	Média	99	21	0
	Mediana	87	0	0
1/1000	1	245	35	0
	3	35	70	0
	3	1.400	0	0
	4	105	0	0
	5	35	0	0
	6	525	280	0
	7	105	0	0
	8	245	70	0
	9	0	35	0
	10	4.795	315	—
	Média	769	80	0
	Mediana	175	35	0
CONTROLES	1	4.375	—	—
	2	21.000	1.330	—
	3	7.825	—	—
	4	35.000	—	—
	5	17.500	1.260	—
	6	10.500	1.085	—
	7	4.725	—	—
	8	4.025	1.995	0
	9	21.000	1.785	0
	10	7.525	—	—
	Média	13.347	1.491	0
	Mediana	9.162	1.330	0

Quarenta camundongos albinos, machos, com 10 g de peso foram divididos em grupos de 10 e a cada grupo se injetou, por via subcutânea, 0,2 ml de uma das frações da "vacina".

Dez animais da mesma procedência, peso e sexo, mantidos nas mesmas condições, foram tomados como contrôles.

Pela técnica da gôta espessa fizemos uma pesquisa de tripanosomas no sangue periférico de todos os animais "vacinados", 8 e 15 dias após a "Vacinação".

Quatro semanas após a imunização todos os animais, inclusive os contrôles, foram infectados, por via peritoneal, com 5.000 tripanosomas/g de peso.

Os flagelados infectantes provinham de sangue heparinizado de camundongos no 8.º dia da infecção com a cepa virulenta Y do *Trypanosoma cruzi*.

A parasitemia de todos os animais foi feita no 8.º, 15.º e 30.º dias após a infecção, usando-se a técnica da contagem pre-conizada por Pizzi e modificada por Brenner (1).

O percentual de sobrevivência dos animais foi tomado também em relação com aquelas datas.

RESULTADOS

Os resultados obtidos se acham resumidos na Tabela 1 e nos Gráficos I e II.

Por eles se verifica que todas as frações da "vacina" protegeram os animais, contudo as que conferiram melhor proteção foram as possuidoras de maior número de parasitas. Os animais imunizados com "vacina" não diluída e diluída a 1/10 não chegaram sequer a apresentar, na sua maioria, parasitemia após a infecção.

Um dos animais protegidos com a "vacina" a 1/10 morreu no 17.º dia pós infecção e embora não tenhamos feito estudo histopatológico, dado o estado de putrefação em que foi encontrado, é quase certo não ter morrido da parasitemia, pois tivera duas parasitemias negativas nos dias 8 e 15 após a infecção.

Os animais protegidos com a "vacina" a 1/1000 que teoricamente receberam 288 tripanosomas vivos, sendo 29 formas metacíclicas, tiveram uma parasitemia discreta (exceção de dois animais) no 8.º e 15.º dia e negativa no 30.º.

A única morte desse grupo se deveu, de fato, à infecção tripanosomótica e ocorreu no 16.º dia pós infecção.

Quanto aos controles comportaram-se como todos os outros das demais experiências nossas em que utilizamos a mesma cepa e a mesma dose infectante (6, 7, 11, 13); i.é., apresentaram uma alta parasitemia no 8.º dia que foi declinando até se tornar negativa no 30.º dia.

A mortalidade se iniciou no 15.º dia pós infecção e se tornou máxima no 21.º dia, conservando o mesmo percentual até o 30.º dia quando a experiência foi considerada encerrada.

As pesquisas parasitárias pós vacinação e pré-infecção foram todas negativas.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

Embora seja possível que venhamos a ter dentro em breve vacinas mortas eficientes contra a tripanosomose sul-americana (2, 4 e 14), os melhores resultados verificados até agora têm sido com as "vacinas" vivas.

Ainda se encontra arraigado no espírito da maioria dos parasitologistas que se dedicam ao estudo da imunidade dessa parasitose, o princípio elaborado em 1931 por Collier (3) de que a imunidade dos animais de laboratório, infectados, está na dependência da presença permanente do parasita no tecido somático.

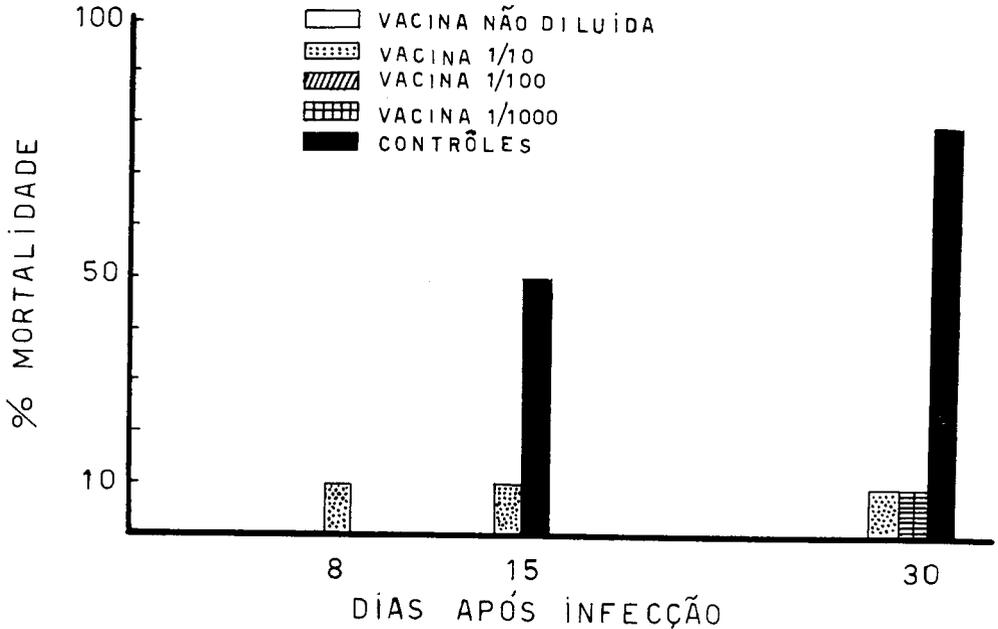
A "premunicação" que é o termo dado a esse tipo de imunidade é, na opinião de Lumsden (5) um termo meramente descritivo, nada significando quanto ao mecanismo imunitário.

Este, segundo o mesmo Autor, deve ser semelhante tanto nas infecções parasitárias como nas viróticas e bacterianas.

No nosso caso estamos convictos de que os parasitas vivos avirulentos usados para imunizar os animais, produzem uma infecção transitória nos mesmos, mas não uma infecção-doença.

Em nenhuma oportunidade conseguimos evidenciar, pelas técnicas usuais de parasitologia e de histologia, parasitas nos animais, quatro semanas após a "vacinação" (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13), embora os mesmos estivessem capacitados a resistir a uma infecção com cepa virulenta. Tudo nos leva a crer que a estrutura antigênica do *T. cruzi* é extremamente lábil e que

GRAFICO Nº 2



qualquer tratamento seja por processos químicos ou físicos induz alterações com perda ou diminuição acentuada do seu poder imunogênico.

Com os tripanosomas vivos da cepa avirulenta os antígenos seriam levados, inalterados, ao interior das células, sem contudo se multiplicarem nas mesmas.

Dêsse modo se desenvolveriam os fenômenos imunitários sem que houvesse doença.

Segundo esta linha de pensamento, admitimos que seja possível, com técnicas refinadas, a obtenção de antígenos com um mínimo de alterações estruturais, capazes de induzir eficiente resposta imunológica.

Até que tal objetivo seja atingido de modo prático, a existência de uma cepa avirulenta, com elevada capacidade imunizante, se nos afigura como a maneira mais

segura de se obter uma adequada proteção dos mamíferos contra infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Tôdas as provas laboratoriais realizadas agora (9 e 10) mostram que a cepa Y cultivada perdeu realmente a capacidade de infectar animais de laboratório, seja qual for a dose e a via empregada.

Como conclusão do presente trabalho verificou-se que aparentemente o grau de proteção (medido sobretudo pelo grau de parasitemia) parece relacionado com um maior número de parasitas vivos inoculados. Essa relação não teria um caráter exponencial pois pequenas quantidades de tripanosomas são capazes de conferir bom estado de proteção (especialmente se se toma como padrão o percentual de sobrevivência), muito próximo daquele conseguido com altíssimas doses de parasitas.

S U M M A R Y

After having demonstrated that the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi* became avirulent to laboratory animals without losing its protective activity against a further virulent infection, the Author concludes that a very small dose of live trypanosomes (about 3 metacyclic forms per gram of body weight) is able to afford good immunity to mice. General considerations about the probable mechanism of the immunity are made.

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. CAPP, S.M.G.; SCHMUNIS, G.A.; TRAVERSA, O.C.; YAVANOVSKY, J.F. & PARODI, A.S. — Complement fixation tests skin test and experimental immunization with antigens of *T. cruzi* prepared under pressure. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 17: 709-715, 1968.
3. COLLIER, W. — Über Immunität bei du Chagas Krankheit du Weissen mans. Z. Hyg. Infektionskr. 112: .. 88-92, 1931.
4. GOBLE, F.C. — Experimental immunology 8.th Int. Cong. Trop. Med. & Malaria. Teheran. 1968. Abstracts & Reviews. Pág. 366.
5. LUMSDEN, W.H.R. — Trends in Research on the Immunology of Trypanosomias. Bull. Wld. Hlth. Org. 37: 167-175, 1967.
6. MENEZES, H. — The effect of phenolated "vaccines" against experimental infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 2:59-66 1968.
7. MENEZES, H. — Protective effect of on avirulent (Cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 10: 1-4, 1968.
8. MENEZES, H. — Lesões histológicas em camundongos "vacinados" com uma cepa avirulenta do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Brasil. Med. 25: 160-165, 1968.
9. MENEZES, H. — I — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Int. Med. trop. São Paulo. No prelo.
10. MENEZES, H. — II — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Em preparo.
11. MENEZES, H. — Active immunization of mice with the avirulent Y strain of *Trypanosoma cruzi* against heterologous virulent strains of the same parasite. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo. No prelo.
12. MENEZES, H. — Lesões histológicas do coração em cães "vacinados" com uma cepa avirulenta do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Med. No prelo.
13. MENEZES, H. — Active immunization of dogs with a non virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo. No prelo.
14. SENECA, H. — Current status of immunization of laboratory animals with *T. cruzi* lipopolysacharide. 8.th Int. Cong. Trop. Med. & Malaria. Teheran. 1968. Abstracts & Reviews. Pág. 367.