

# IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM «VACINA» VIVA AVIRULENTE DE TRYPANOSOMA CRUZI —

## IV — Ensaio de esquema de «vacinação» \*

Humberto Menezes

*A parasitemia e o exame histológico revelaram que, aparentemente, camundongos que receberam duas doses de "vacina" reagiram melhor a uma infecção virulenta do T. cruzi do que animais "vacinados" uma única vez.*

*Nestes a infecção realizada quatro ou dez semanas depois da imunização não alterou substancialmente a resposta imunitária medida pela parasitemia, percentual de mortalidade e grau da resposta tissular.*

*Animais unicamente "vacinados", com uma ou duas doses, não apresentaram alterações histológicas diferentes das dos animais normais.*

*Estes mostraram quase sempre um discreto grau de inflamação crônica focal no miocárdio, e fígado.*

Procuramos em trabalhos anteriores demonstrar experimentalmente qual o menor inóculo capaz de conferir eficiente proteção a camundongos (8) e qual o tempo máximo de proteção que se pode conseguir nessa espécie de animal contra uma infecção por formas virulentas de *T. cruzi* (7).

Como em nossos trabalhos prévios empregamos sempre uma única dose de "vacina" (2, 5, 6) e como existe na literatura especializada referências a reações hiperérgicas em animais imunizados (9), decidimos realizar o presente experimento com o objetivo de observar as diferenças porventura existentes na resposta imunológica entre animais "vacinados" com uma e com duas doses.

### MATERIAL E MÉTODOS

A primeira vacina utilizada constou de um cultivo de 7 dias da cepa Y avirulenta.

Esta cepa que designamos de PF (Pedreira de Freitas) foi cultivada em meio líquido de Nöller e após centrifugação a

baixa velocidade, o sedimento foi isolado e lavado várias vezes em solução salina.

Por fim, foi feita uma suspensão nesse mesmo líquido, dando uma concentração de  $2 \times 10^7$  parasitas por ml com cerca de 70 por cento de formas vivas e mais ou menos 2 por cento de formas metacíclicas.

A segunda vacina foi obtida de modo semelhante, porém o número de flagelados vivos foi de aproximadamente 10 por cento, conservando-se inalterados os outros valores.

Cem camundongos albinos machos, de uma mesma linhagem, com 10g de peso corporal no início da experiência, foram divididos em 6 grupos sendo 4 de 20 e 2 de 10 animais.

Os quatro primeiros foram designados de A, B, C e D e os dois últimos de E e F. Os animais dos grupos A, B, C, e E foram "vacinados" por via subcutânea com 0,1 ml da primeira e/ou segunda vacina, conforme demonstração na Tabela 1.

Os camundongos dos grupos A, B e C foram infectados, por via peritoneal (5.000

\* U.S.P. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.  
Recebido para publicação em 12-1-70.

TABELA 2

Grupo	Camundongo	Número de parasitas 5mm <sup>3</sup> de sangue		
		Dias após a infecção		
		8	15	30
A	1	35		0
"	2	385	35	0
"	3	105	280	0
"	4	—	35	0
"	5	0	—	0
"	6	105	0	0
"	7	0	0	0
"	8	140	0	0
"	9	70	35	0
"	10	0	—	0
"	11	0	0	0
"	12	35	0	0
"	13	0	0	0
"	14	210	0	0
"	15	35	0	0
"	16	35	0	0
"	17	35	0	0
"	18	140	35	0
"	19	0	0	0
"	20	140	35	0
	Média	77,3	27,2	0
	Mediana	35,0	0	0
B	1	70	0	0
"	2	70	175	0
"	3	35	0	0
"	4	0	0	0
"	5	70	70	0
"	6	0	0	0
"	7	490	0	0
"	8	35	35	0
"	9	770	0	0
"	10	—	—	0
"	11	0	0	0
"	12	175	0	0
"	13	490	35	0
"	14	—	—	0
"	15	0	0	0
"	16	210	70	0
"	17	0	0	0
"	18	140	0	0
"	19	35	140	0
"	20	70	0	0
	Média	147,0	29,0	0
	Mediana	70,0	0	0

Os animais "vacinados" que morreram no decorrer do experimento tiveram por "causa mortis" geralmente infecções intercorrentes.

Os exames histopatológicos dos animais dos diversos grupos mostraram que mesmo os animais normais (Grupo F), quer tivessem 40 ou 70 dias de idade, apresentavam, em sua grande maioria, discretos focos de infiltração histio-linfocitária no miocárdio (Fig. 1A).

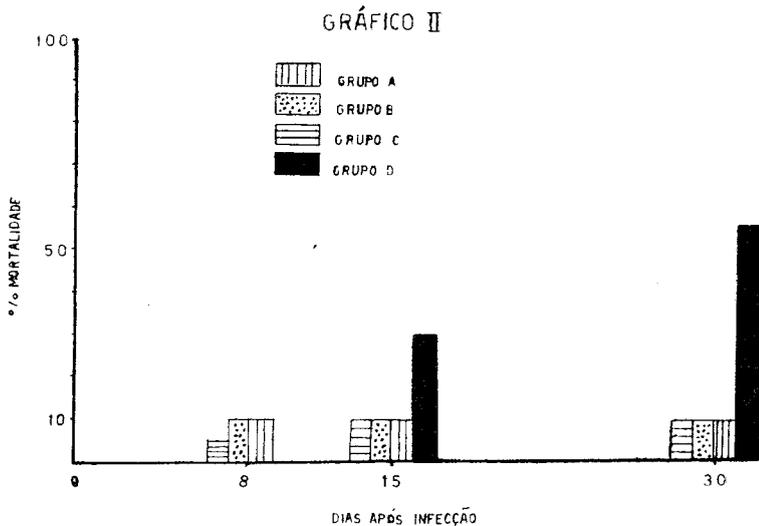
Quadro idêntico foi encontrado em animais unicamente "vacinados", tanto nos que receberam uma única dose da vacina (Fig. 1B), como nos que receberam duas.

Amiloidose foi encontrada em 25 por cento dos animais examinados do grupo B e em 50 por cento dos examinados do grupo D (contrôles).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O emprêgo de duas doses de "vacina" parece conferir melhor proteção aos animais, conforme se pode deduzir do menor grau de parasitemia e da discreta reação inflamatória crônica encontrada no miocárdio dos mesmos.

A ocorrência da reação hiperérgica em animais vacinados, descrita por Pizzi (9)



Dos animais "vacinados" e posteriormente infectados, os que receberam duas doses da "vacina" (Grupo A) foram os que mostraram menor grau de infiltração histio-linfocitária no miocárdio (Fig. 1C), comparável àquele encontrado nos grupos anteriormente referidos.

Como foi observado anteriormente (3, 4), o infiltrado foi um pouco mais intenso nos animais contrôles (grupo D) (Fig. 1F).

Os animais do grupo B (1 dose de vacina e infecção depois de 4 semanas) (Fig. 1E) exibiram processos inflamatórios de grau ligeiramente mais pronunciado do que os do grupo C (1 dose de vacina e infecção 10 semanas depois) (Fig. 1D).

Em nenhum dos animais examinados foi possível encontrar parasitas no miocárdio, no fígado ou no baço.

não foi por nós confirmada em experiências anteriores (3 e 4).

No presente trabalho essa discrepância persiste, pois verificamos que a reação histológica nos animais contrôles foi maior do que nos "vacinados".

Os camundongos com duas doses de "vacina" e infectados posteriormente (grupo A) mostraram discreta reação inflamatória crônica.

Os grupos que receberam só uma dose de vacina (grupos B e C) ocuparam uma situação intermediária entre os anteriores (A, E e F) e o grupo controle da infecção (Grupo D).

A introdução de um grupo de animais normais (Grupo F) foi de grande utilidade, pois serviu para demonstrar que não se deve valorizar muito o encontro de discre-

TABELA 3

Grupo	Camundongo	Número de parasitas/5mm <sup>3</sup> de sangue		
		Dias após a infecção		
		8	15	30
C	1	245	0	0
	2	210	0	0
	3	0	0	0
	4	175	105	0
	5	175	0	0
	6	140	0	0
	7	0	0	0
	8	665	0	0
	9	35	0	0
	10	105	35	0
	11	0	0	0
	12	—	—	—
	13	140	70	0
	14	0	35	0
	15	—	—	—
	16	70	0	0
	17	70	35	0
	18	595	0	0
	19	35	35	0
	20	0	0	0
	Média	147,0	17,5	0
	Mediana	87,5	0	0
D	1	17.500	—	—
	2	2.730	1.820	0
	3	8.750	—	—
	4	3.290	—	—
	5	3.780	—	—
	6	3.255	1.855	0
	7	3.780	2.310	0
	8	3.115	2.485	0
	9	4.025	—	—
	10	4.025	1.680	—
	11	4.725	2.940	0
	12	3.990	—	—
	13	3.045	3.570	—
	14	3.500	2.730	0
	15	3.150	2.030	—
	16	3.500	2.660	—
	17	3.115	2.975	0
	18	2.555	3.780	—
	19	3.815	3.360	0
	20	2.765	1.890	0
	Média	4.420	2.577	0
	Mediana	3.500	2.572	0

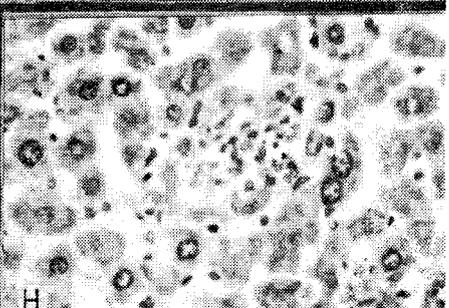
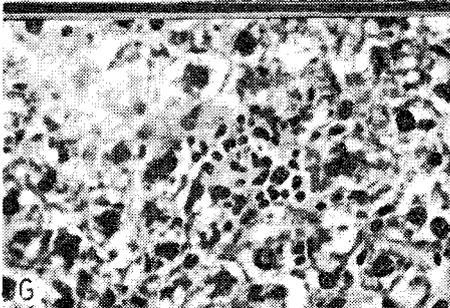
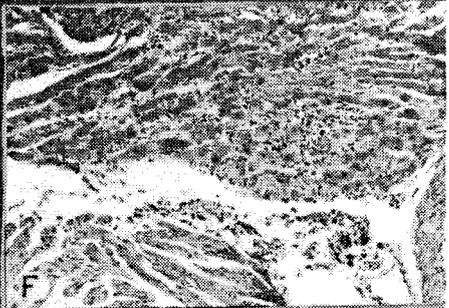
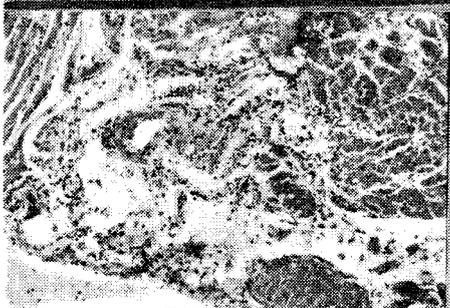
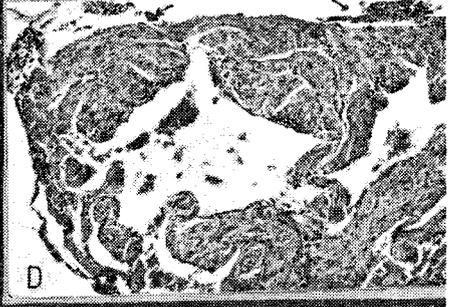
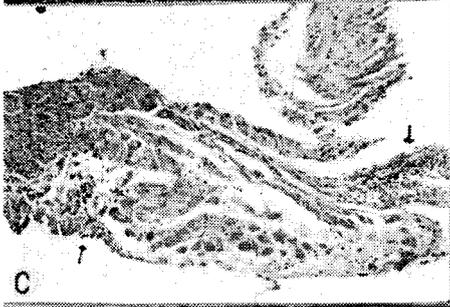
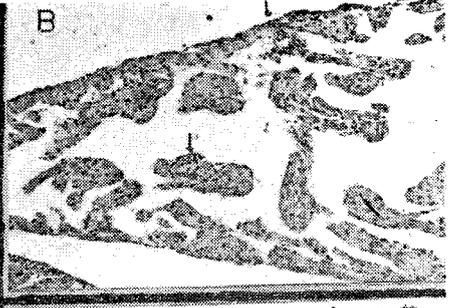
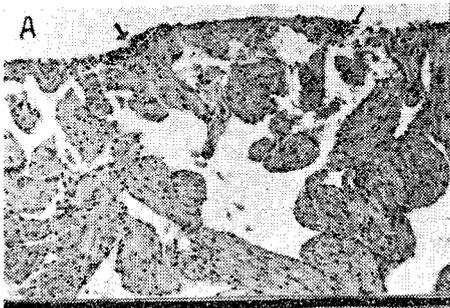


Fig. 1

- A — Raros e discretos focos de infiltração histio-linfocitária no epicárdio atrial (setas) de camundongo normal. (Grupo F). 125 x.
- B — Raros e discretos focos de idêntica infiltração no epicárdio e endocárdio (setas) atrial de camundongo unicamente «vacinado». (Grupo E). 125 x.
- C — Aspecto idêntico, no átrio de animal «vacinado» duas vêzes e infectado. (Grupo A). 125 x.
- D — Moderados focos de infiltração histio-linfocitária no epicárdio atrial do animal «vacinado» uma única vez e infectado 10 semanas depois. (Grupo D). 125 x.
- E — Pronunciada infiltração histio-linfocitária do tecido areolar em tórno da origem dos vasos da base, no coração de um animal «vacinado» uma só vez e infectado 4 semanas depois. (Grupo E). 125 x.
- F — Pronunciado infiltrado linfo-histocitário sub-endocárdico e intra-mural na base dos ventrículos de um animal contróle. (Grupo D). 125 x.
- G — Pequeno aglomerado de histiocitos e linfócitos no parênquima hepático de um camundongo normal. (Grupo F). 600 x.
- H — Idem em um animal contróle (Grupo D). 600 x.

tos focos de infiltração histio-linfocitária no miocárdio.

O mesmo se pode dizer com respeito à presença de pequenos aglomerados de histiócitos e linfócitos no fígado de animais infectados (Fig. 1H) que também foi observada em nossos animais normais (Fig. 1G) e nos unicamente "vacinados".

A infecção realizada 4 ou 10 semanas após o emprêgo de uma só dose de "va-

cina" não parece ter alterado significativamente os resultados histológicos e parasitológicos nos animais dos respectivos grupos (B e C).

Antes de encerrar convém assinalar que existem diferenças individuais bem acentuadas dentro de cada grupo não só no que se refere à parasitemia como também à histopatologia; o que acima está referido se prende à freqüência média dentro de cada agrupamento.

#### SUMMARY

*Parasitemia and histologic findings have shown that mice receiving two doses of the "vaccine" appear to react better to an infection with a virulent strain of T. cruzi than those "vaccinated" once.*

*In the latter, the infection on the following fourth or tenth week after the immunization doesn't alter, in a substancial manner, the immune response measured by parasitemia, mortality percentage and degree of inflammatory reaction.*

*The mice just "vaccinated" with one or two doses of the "vaccine" and not being injected afterwards, didn't show any hystologic difference from the non-vaccinated ones. In those a slight focal chronic inflammatory reaction could almost always be observed at the myocardium and liver.*

#### BIBLIOGRAFIA

1. BRENNER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas. Tese. Fac. Farm. Odont. Univ. Minas Gerais, B. Horizonte, 1961.
2. MENEZES, H. — Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 10:1-4, 1968.
3. MENEZES, H. — Lesões histológicas em camundongos "vacinados" com uma cepa virulenta de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Med., 25:160-165, 1968.
4. MENEZES, H. — Lesões histológicas do coração em cães "vacinados" com uma cepa avirulenta de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Med., 26:281-283, 1969.
5. 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, 11:335-342, 1969.
6. MENEZES, H. — Active immunization of dogs with a non virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo: 11: 258-263, 1969.
7. MENEZES, H. — Imunização de camundongos com "vacina" viva avirulenta de *Trypanosoma cruzi*. II — Ensaio de avaliação do tempo de eficácia da "vacina", Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 4: 1-9, 1970.
8. MENEZES, H. — Imunização de camundongos com "vacina" avirulenta de *Trypanosoma cruzi*. I — Ensaio de avaliação do menor inóculo eficiente. Rev. Soc. Brasil. Med. Trop. 3: 1969.
9. PIZZI, T. — Immunology of Chagas' disease. Present status of the problem. Boll. Offic. Sanit. Panam., 51: 450-464, 1961.