

IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM «VACINA» VIVA AVIRULENTA DO TRYPANOSOMA CRUZI

III — VARIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Humberto Menezes * e Rosa D. R. Albuquerque **

Os autores demonstram através de testes em camundongos que variando o meio de cultivo a avirulência da cepa Y, cultivada, do Trypanosoma cruzi se conserva inalterada.

Diante da possibilidade de que se trate de um mutante da mesma linhagem Y virulenta, mantida em animais, sugerem a designação de PF (Pedreira de Freitas) para essa nova cepa.

INTRODUÇÃO

Admitindo-se que os processos de transição, no ciclo vital dos tripanosomas, envolvam alguma fase ou fases críticas termossensíveis que possam ser induzidas por modificações do meio nutriente (12) e que vários fatores ligados ao meio de cultura influenciem a infectividade de formas de cultura (3), propusemo-nos verificar o comportamento da avirulência da cepa Y, mantida em cultura em diferentes meios.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos a cepa Y, isolada por Silva & Nussenzweig (11), sob a sua forma avirulenta descrita por um de nós (4, 5).

Essa cepa do *Trypanosoma cruzi*, além do cultivo em meio sólido de Packchianian (10), foi também cultivada nos meios líquidos de Warren (13) e de Nöller (9). Nos dois primeiros, os repiques foram feitos cada 15 dias e no último cada 8 dias.

As culturas foram mantidas à temperatura ambiente que em Ribeirão Preto variou de 10,5°C a 42,0°C.

As experiências foram conduzidas nas épocas de maior e de menor elevação térmica.

As culturas com 20 a 25 dias, no meio de Packchianian, com 15 dias no de Warren e com 8 dias no de Nöller foram centrifugadas e lavadas várias vezes em solução salina, até se obter um sobrenadante límpido.

A concentração final dos tripanosomas variou de $2,5 \times 10^6$ a 5×10^8 parasitas por ml.

O percentual de formas metacíclicas foi de aproximadamente 5 por cento no meio de Warren, 2,5 por cento no de Nöller e de cerca de 10 por cento no de Packchianian.

As "vacinas" foram utilizadas logo após o seu preparo e tinham sempre formas vivas, cuja percentagem variou de 50 a 90 por cento.

As experiências foram conduzidas em camundongos albinos de uma mesma linhagem, mantida há 16 anos no Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os animais eram todos do sexo masculino e pesavam, no início da experimentação, 10 g, em média.

(*) U.S.P. Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
(**) Departamento de Ciências Biológicas. Fac. Far. Odont. Ribeirão Preto.

Foram utilizados 156 camundongos, divididos em 4 grupos.

No primeiro grupo havia 36 animais que foram "vacinados por via subcutânea com 0,2 ml da "vacina" preparada em meio de Packchanian.

Com a "vacina" de Warren foram imunizados 22 camundongos e com a do meio de Nöller 19.

Quatro semanas após, todos os animais "vacinados" e mais 79 outros, tomados como contrôles, foram inoculados com tripanosomas da cepa Y, virulenta, do *Trypanosoma cruzi*, mantida em camundongos.

O inóculo foi o mesmo para todos os animais, i.e., 5.000 parasitas por grama de peso corporal.

Antes da infecção virulenta foi feito xenodiagnóstico em 10 dos camundongos imunizados com a "vacina" do meio de Nöller e em 8 dos do meio de Warren.

Cinco ninfas de *Rhodnius prolixus* foram aplicadas a cada animal do primeiro grupo e cinco ninfas de *Rhodnius neglectus* a cada um dos 8 animais do segundo grupo. Todos os triatomíneos se mostraram isentos de tripanosomas quando foram examinados 30 dias depois.

Parasitemias dos camundongos infectados foram realizadas segundo a técnica de Pizzi-Brener (1), nos 8.º, 15.º e 30.º dias após a inoculação.

Os percentuais de mortalidade foram referidos a essas datas e as experiências foram consideradas encerradas no 30.º dia, embora, em alguns casos, os animais tivessem sido observados até 90 dias, sem modificações nos resultados.

RESULTADOS

A Tabela 1 e os Gráficos I e II resumem os dados obtidos.

Evidencia-se pelos mesmos uma nitida e forte proteção, conferidas pelas 3 vaci-

nas que não diferem significativamente entre si.

O percentual de mortalidade foi insignificante entre os animais imunizados (11 por cento, 4 por cento e 0 por cento) mas em contraposição mostrou-se extremamente elevado (81 por cento) entre os animais contrôles.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Um de nós (6, 7) já demonstrou que em hospedeiros vertebrados, a forma avirulenta do *Trypanosoma cruzi* conserva sua avirulência, a despeito dos vários meios empregados, seja para diminuir a resistência do hospedeiros, seja para exacerbar a virulência do flagelado.

Monteiro (8) conseguiu demonstrar que também no hospedeiro invertebrado o tripanosoma da cepa avirulenta não é capaz de retornar à sua primitiva virulência para camundongos.

Com o presente trabalho verificamos que, pelo menos com os meios de cultura empregados, a avirulência do tripanosoma se mantém inalterada, quando se faz variar o meio nutriente.

Embora nos faltem estudos cito-genéticos, estamos cada vez mais inclinados a admitir que a cepa cultivada, com a qual temos trabalhado, representa um mutante da cepa Y que até hoje se tem mantido altamente virulenta, por sucessivas passagens, em camundongos.

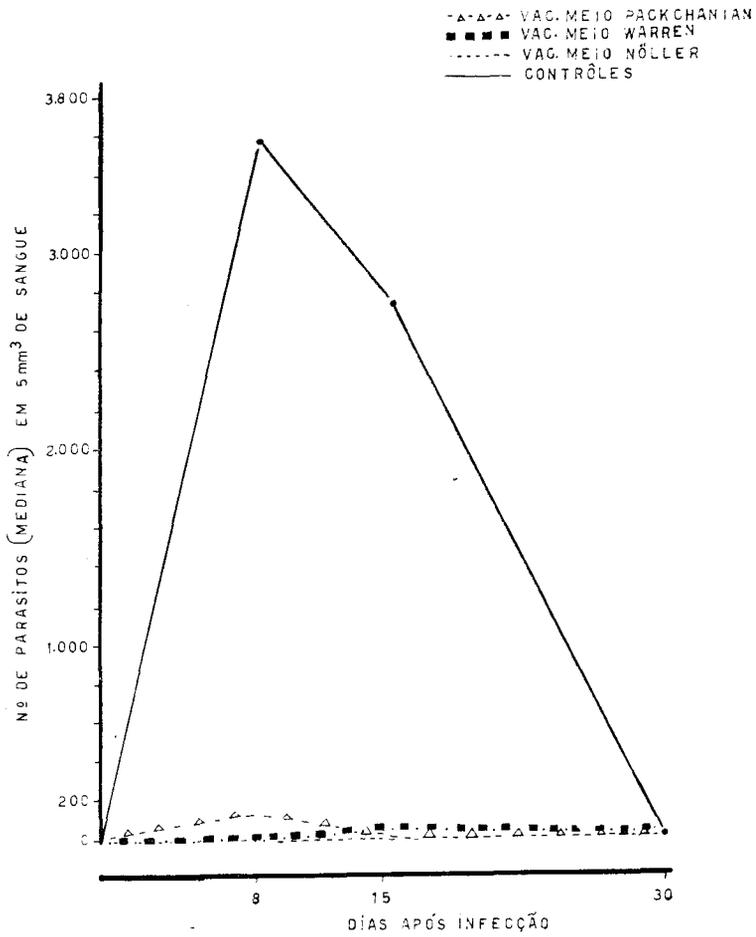
Dêsse modo e caso essa suposição se veja confirmada por estudos laboratoriais adequados, julgamos justo considerar a cepa avirulenta como uma nova linhagem para a qual sugerimos desde logo a designação PF em homenagem a Pedreira de Freitas (2), que chefiou a equipe que estudou a paciente de quem a cepa Y foi isolada.

S U M M A R Y

The authors through experiments in mice have demonstrated that the avirulence of the Y strain of T. cruzi, described by one of them (H.M.) remain unaltered if the culture medium is changed.

Accepting that there are strong evidences that such strain represents a mutant of the virulent Y strain, kept in mice, the authors suggest the designation PF for the new strain, as an homage to the late Pedreira de Freitas who discovered and examined the japanese patient from whom the Y strain of the Trypanosoma cruzi was isolated.

GRAFICO 1

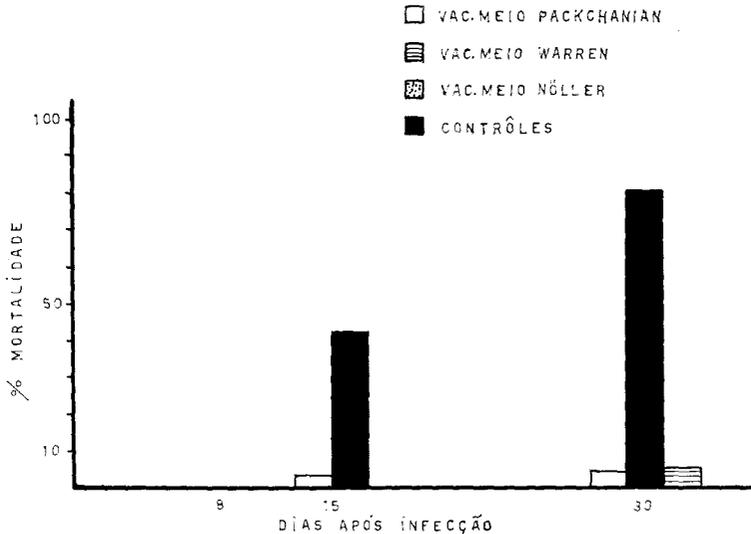


TABELA

Meio de cultura da vacina	Número de camun- dongos	8.º dia pós infec.	
		Parasitemia (mediana)	N.º mortes
Packhanian	36	87	0
Warren	22	0	0
Nöller	19	0	0
Total de vacinados	77		
Contrôles	79	3780	0

15.º dia pós infec.		30.º dia pós infec.	
Parasitemia (mediana)	N.º mortes	Parasitemia (mediana)	N.º mortes
0	2	0	4
35	0	0	1
0	0	0	0
2940	34	0	64

GRAFICO II



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. FREITAS, J.L.P.; LION, M.F. & PARTARI, J.T.A. — Resultados de uma investigação sobre Moléstia de Chagas realizada no Município de Marília e outros, com estudo clínico de dois casos agudos da doença. Rev. Hosp. Clínicas (S. Paulo). 8:81-92, 1953.
3. GEIGY, R. & KAUFMANN — On the infectivity of culture trypanosoma of the *T. brucei* group. 8th Int. Congre. Trop. Med. Malária, Teheran, 1968 (Abstracts Reviews, pág. 324).
4. MENEZES, H. — Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *T. cruzi* against experimental infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 10:1-4, 1968.
5. MENEZES, H. — Active immunization of dogs with a non avirulent strain of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 11:258-263, 1969.
6. MENEZES, H. — I — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo — No prelo.
7. MENEZES, H. — II — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo — No prelo.
8. MONTEIRO, J.C. — A avirulência da cepa Y cultivada, do *T. cruzi*, no hospedeiro invertebrado. Em elaboração.
9. NÖLLER, W. — Blut und Insektenflagellaten Züchtung auf Platten. Arc. Schiff. u. Tropen. Hyg. 21:53-94, 1917.
10. PACKCHANIAN, A. — On the cultivation of seven species of *Trypanosomes* in vitro. Science. 80:407-408, 1934.

11. SILVA, L.H.P. de C. & NUSSEN-ZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *T. cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia. Clin. Biol. (S. Paulo). 20:191-208, 1953.
12. SILVA, L.H. PEREIRA; & CAMARGO, E.P. — Differentiation in the life cycle of trypanosomes. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 6:188-192, 1964.
13. WARREN, L.G. — Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*. Chagas. I — Effect of culture age and concentration on respiratory rate. J. Parasit. 46:529-539, 1960.