

NOTA PRELIMINAR SOBRE A PROTEÇÃO INDUZIDA PELO *T. hastatus* (Trypanosoma "cruzi-like" DO MORCEGO *P. hastatus hastatus*) EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CEPA Y DO *T. cruzi*.

William Barbosa *, Ana Cândido Czerewuta **, José Martins de Souza ***

RESUMO

Trypanosoma hastatus quando inoculado na dose de 3.000 formas epimastigotas por 0,5 ml, por variadas rotas, semanalmente, induz a proteção de camundongos, desafiados, após a última dose de imunização com cepa Y virulenta, na dose de 100.000 formas epimastigotas na fase exponencial de crescimento, por via intraperitoneal.

A proteção foi avaliada pelos parâmetros: índices parasitêmicos, avaliados periodicamente, no 2º, 5º, 6º, 7º e 12º dias de mortalidade verificada até o 22º dia após a dose desafiante.

A média do índice de parasitemia foi três vezes maior no grupo controle no 5º dia e quinze vezes, aproximadamente, no 12º dia em relação ao grupo imunizado. Do grupo controle, 61,5% morreram até o 19º dia e só depois deste dia morreram os três animais (23%) dos imunizados.

UNITERMOS: Vacina, *T. hastatus*, Doença de Chagas.

INTRODUÇÃO

A tentativa de imunoprofilaxia na Doença de Chagas é uma meta antiga, de muitos Centros de Pesquisa, onde numerosos pesquisadores vêm tentando obter imunização ativa contra esta doença (2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 37, 38, 40, 41), o que infelizmente, vem esbarrando

em inesperadas dificuldades — visto não se dispor com segurança, de uma cepa de *T. cruzi*, absolutamente não patogênica.

E discutível mesmo, que a infecção pelo próprio *T. cruzi*, induza sempre, em animais recuperados, sobreviventes, imunidade absoluta (3), embora nas investigações iniciais de 1912, 1913 (2,5), e logo, posteriormente, em 1931 e 1941 (6,8), tivesse sido observada completa imunidade às reinfecções.

* Prof. Titular, Chefe da Unidade de Investigação Gaspar Viana/IPTESP.

** Profa. Assistente do Depto. de Medicina Tropical/IPTESP

*** Prof. Assistente do Depto. de Parasitologia/IPTESP

Muitos experimentos, usando variadas cepas de *T. cruzi*, têm sido descritos, nos quais foram observados variados graus de proteção (3, 4, 13, 15, 24, 28, 29).

Mesmo o emprego de outros trypanosomatídeos, como o *T. lewisi* e *Herpetomonas pessoai* (12, 34, 39, 40) já foram usados em animais de laboratório, eficazmente.

Os resultados têm sido desalentadores, tanto com o emprego de parasitas mortos (13, 14, 16, 17, 18, 36, 37, 38) quanto com formas vivas (11, 12, 19, 31, 33, 34, 35).

Estas últimas, porém, teriam que ser avirulentas, ou de virulência atenuada (23).

Culturas atenuadas de baixa virulência, sob certas condições, podem readquiri-la, com o uso de corticosteróides nos animais inoculados (31).

Admite-se que cepas atenuadas por longos períodos de passagens em culturas, como a cepa PF de Menezes, possam perder sua patogenicidade e manter sua antigenicidade e imunogenicidade, sendo eficazes e não patogênicas mesmo em animais, artificialmente depletados (24, 25, 26) o que tem sido refutado por outros autores que obtiveram reisolamento da cepa PF após inoculação de camundongos. É certo que algumas amostras da própria cepa Y, que deu origem à cepa PF, mantenha, ao contrário desta, mesmo após inúmeras passagens em meios de cultivo, a capacidade de tornar-se virulenta após 2 ou 3 passagens em camundongos, conforme documentou FERNANDES (10).

Tentando contornar estas dificuldades, ultimamente, a tendência é tentar a indução de proteção pelo uso de frações

imunógenas específicas (monoespecíficas) constituídas por glicoproteínas de superfície do próprio *T. cruzi* patogênico SCOTT E NEAL, 1984.

Apesar de tudo, achamos válido fazer mais uma tentativa com *Trypanosoma cruzi* cepa *hastatus*, de *Phyllostomus hastatus hastatus*, que imunologicamente, identificamos ao *T. cruzi* e que foi incluído por BAKER e cols. (1) face à proximidade de seus caracteres bioquímicos – padrão de densidade flutuante do DNA do núcleo e cinetoplasto, e seu zimodema, como uma subespécie distinta: O *T. cruzi marinkellei* ssp nov. diferenciando-o do *T. cruzi stricto sensu*”, ficou com o nome da subespécie *T. cruzi cruzi* Chagas, 1909.

O parasita, a nosso ver, é provavelmente o resultado de um processo mutacional ocorrido espontaneamente na natureza, por perda de ligação com o vetor habitual, o triatomíneo, e passagens múltiplas e sucessivas em quirópteros que lhes emprestaram a qualidade de perder sua virulência e manter sua imunogenicidade.

Esta nota preliminar é a reprodução de um experimento realizado com a saudosa pesquisadora Maria do Carmo Moreira de Souza a quem rendo, neste momento, uma homenagem, em que verificamos apenas a capacidade imunogênica do *T. hastatus*, na ausência de patogenicidade.

MATERIAL E MÉTODOS

A – *Trypanosoma hastatus*

O *T. hastatus* foi mantido em LIT em repiques de 10 em 10 dias, em estufa a 28° C.

B – *Trypanosoma Y*

Foi também mantido em LIT, em estufa a 28° C, com repiques quinzenais e passagem por camundongos, periodicamente, visando manter sua patogenicidade.

C – A obtenção da massa de células

A suspensão do *T. hastatus* foi obtida a partir de uma cultura de 10 dias de crescimento, centrifugadas a 3.000 rpm e lavadas três vezes em solução fisiológica. A avaliação da concentração de células foi feita pela contagem dos flagelados em câmara de Neubauer para concentração de 3.000 formas epimastigotas por camundongo em volume de 0,1 ml.

A massa de células do *T. cruzi* foi obtida da mesma forma e usando uma concentração de 100.000 (1×10^5) no volume de 0,1 ml no 15º dia de crescimento, para cada camundongo.

ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

Camundongos com peso entre 15 e 25 gramas de ambos os sexos – mantidos separadamente – da raça swiss star, foram submetidos a 4 (quatro) inoculações por semana, a primeira na pata, a segunda no

peritônio, a terceira no tecido subcutâneo e a última também por via intraperitoneal.

O desafio foi realizado 3 (três) dias após a última dose da “vacina” com 1×10^5 formas epimastigotas da cepa Y virulenta por via intraperitoneal.

O experimento foi sempre realizado com dois lotes de treze camundongos, um destinado à imunização e outro servindo de controle.

O controle foi realizado pelo índice parasitário feito pela contagem de parasitas colhidos do sangue da cauda do camundongo, periodicamente, a cada dia, até o 12º dia; e o índice de mortalidade avaliado percentualmente, após o 14º dia do desafio até o 22º dia.

RESULTADOS

Os resultados encontram-se resumidos na FIGURA 1 e TABELA I, onde se observa que o índice de parasitemia foi muito baixo nos animais imunizados e o percentual de mortalidade dos animais controles foi muito mais precoce e muito mais elevado do que os animais imunizados, que só se iniciou no décimo nono dia após a inoculação.

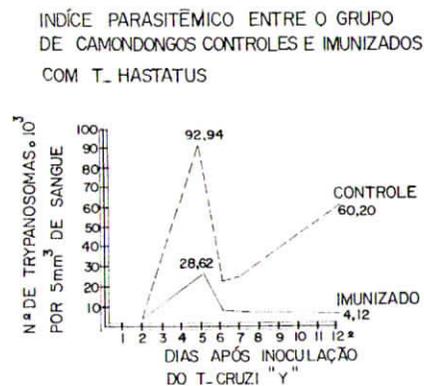


TABELA 1: Índice parasitêmico dos grupos controle e imunizado com *T. hastatus*, inoculados com cepa y virulenta

| DIA | ANIMAIS | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | | 7 | | 8 | | 9 | |
|-----|---------|-------|------|------|-------|-------|------|-------|------|-------|-----|------|------|------|------|-------|------|-------|---|---|
| | I* | C** | I | C | I | C | I | C | I | C | I | C | I | C | I | C | I | C | I | C |
| 2º | 70 | 70 | 0 | 0 | 0 | 70 | 70 | 70 | 70 | 140 | 0 | 0 | 70 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5º | 980 | 10220 | 1470 | 4970 | 30000 | 14210 | 1820 | 10500 | 5880 | 11480 | 560 | 8820 | 3220 | 5810 | 1120 | 2240 | 3710 | 15400 | | |
| 6º | 490 | 3080 | 140 | 1680 | 2030 | 1610 | 140 | 1680 | 2100 | 2380 | 280 | 1610 | 840 | 1260 | 140 | 1260 | 1610 | 6230 | | |
| 7º | 420 | 1890 | 1320 | 2660 | 420 | 2800 | 210 | 560 | 140 | 2660 | 70 | 2660 | 0 | 2520 | 1960 | 4200 | 140 | 2940 | | |
| 12º | 840 | 7980 | 1260 | 1330 | 210 | 3290 | 350 | 5040 | 630 | 700 | 70 | 2450 | 560 | 1960 | 210 | 28140 | 420 | 3290 | | |

I* - Grupo Imunizado - 1 - 13/7/77, 2 - 14/7/77, 2 - 15/7/77, 3 - 18/7/77

C** - Grupo Controle - 1 - 19/7/77, 1 - 20/7/77, 1 - 21/7/77

COMENTÁRIOS

Nesta investigação preliminar foi possível constatar que a inoculação do *T. hastatus*, em pequenas doses correspondentes a 3.000 epimastigotas, em inóculos semanais por um mês, pelas rotas - subcutânea, intramuscular (pata) e peritoneal — foi capaz de induzir uma imunidade que, conquanto, não esterilizante, foi muito evidente, sugerindo uma perfeita identidade antigênica entre o *T. hastatus* e o *T. cruzi*.

Estas observações são completamente opostas às de BAKER e cols. (1) que se referem à falta de proteção com os "stoks" B3, B7, B29 e B34, pela inoculação de suas culturas e subseqüentes desafios com *T. cruzi*, todos tornando-se infectados, com padrões de infecção indistinguível do controle. Estas cepas provieram de São Felipe na Bahia, isoladas por MILLES E BARRET do *Phyllostomus discolor*.

Aliás, sob este mesmo aspecto — comunidade antigênica — cometem BAKER e cols. (1) outro deslize, citando o trabalho de BICE E ZELEDON sobre a comparação do *Trypanosoma vespertilionis* e *Trypanosoma cruzi* — pois neste trabalho realmente existe uma fundamental diferença entre os trypanosomas experimentados, ao contrário do que ocorreria, se o estudo comparativo fosse feito com *T. hastatus*, em que estaria presente, sem dúvida, a fração 5, característica do *T. cruzi*.

SUMMARY

Preliminary note, protection induced by *T. hastatus* (*T. cruzi* like from bat *P.*

hastatus hastatus) in mice inoculated with "y" strain of *T. cruzi*.

Mice were inoculated 3×10^3 epimastigotes forms of *T. hastatus* in 0,5 ml. for different routes, weekly. Protection was obtained when virulent strain "y" 10×10^5 epimastigotes in exponential phase of growth, by intraperitoneal route were used as challenge.

Mice were examined for counts of parasites in the blood stream on days 2, 5, 6, 7 and 12th and mortality rates until 22 days after challenge.

Mean of parasitemic index was 3 times higher in control group on day 5 and 15 times higher on day 12, in relation to protected mice.

61,5 mice of control group died up to day 19, and only 3 (23%) mice from immunized group died after day 19.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 — BAKER, J.R.; MILES, M.A.; GODFREY, D.G. & BARRET, T.V. — Biochemical characterization of some species of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) from bats (*Microchiroptera*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27(3): 483-491, 1978.
- 02 — BLANCHARD, M. — Marche de l'infection à *Schizotrypanum cruzi* chez le cobaye et la souris. *Bull. Soc. Path. Exot.* 5: 598-599, 1912.
- 03 — BRENER, Z. — Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 4: 119-123, 1962.
- 04 — BRENER, Z. — Alguns aspectos da imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com *T.*

- cruzi*". Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 9: 233-238, 1967.
- 05 - BRUMPT, E. - Immunité partielle dans les infections à "Trypanosoma cruzi", transmission de ce trypanosome par "Cimex rotundatus". Role régulateur des hôtes intermédiaires passage à travers la peau. Bull. Soc. Path. Exot., 172-176, 1913.
- 06 - COLLIER, W. A. - über immunität bei der chagaskrankheit der weissen Maus. Z. Hyg. Infektr krankh., 112: 88-92, 1931.
- 07 - CULBERTSON, J. T. & KOLODY, M.H. - Acquired immunity in rats against "Trypanosoma cruzi". J. Parasit. 24: 83-90, 1938.
- 08 - DARMAN, M. Multiplication du "Trypanosoma cruzi" dans le sang périphérique de la souris pour passages successifs. Recherche de la prémunition in a vis des souches homologues et hétérologues. Ann. Par. Hum. et Coop., 18: 166-179, 1941.
- 09 - DIAS, E. - Estudos sobre o "Schizotrypanum cruzi". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 28: 1-110, 1934.
- 10 - FERNANDES, J. F. - Estado atual da vacinação contra a doença de Chagas. Rev. Bras. Med. 18: 105-108, 1970.
- 11 - FERNANDES, J. F.; HALSMAN, M. & CASTELLANI, O. - Effect of Actinomycin D on the infectivity of "Trypanosoma cruzi". Nature 207: 1004-1005, 1965.
- 12 - GARCIA, W.; MULHPFORDT, H. - Infección de "Trypanosoma cruzi" en ratones después de su tratamiento con "Trypanosoma lewisi". Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 11(1): 13-18, 1969.
- 13 - GOBLE, F.C.; GRIMM-WEHNER, M. & KONRATH, M. - Vaccination against experimental Chagas' disease with homogenates of culture forms of "T. cruzi". J. Parasit. 50: 19, 1964, Sec. 2.
- 14 - GONZALEZ CAPPA, S. M.; SCHMUNIS, G. A.; TRAVERSA, D. C.; YANOVSKY, J. F. & PARODI, A. S. - Complement-fixation test skin test and experimental immunization with antigen of "T. cruzi" prepared under pressure. The Am. J. Trop. Med. & Hyg. 17: 709-715, 1968.
- 15 - HAUSCHKA, T. S.; GOODWIN, M. B.; PALMQUIST, J. & BROWN, E. - Immunological relationship between seven strains of "Trypanosoma cruzi" and its applications in the diagnosis of Chagas disease. Am. J. Trop. Med., 30: 1-16, 1950.
- 16 - JONHSON, P.; NEAL, R. A. & GALL, D. - Protective effect of killed Trypanosome vaccines with incorporated adjuvants. Nature 200: 83, 1962.
- 17 - LAVERAN, A. - Essais d'immunisation contre des trypanosomes pathogènes. Bull. Soc. Path. Exot. 5: 877-882, 1912.
- 18 - LAVERAN, A. & RONDOSKY, D. - Essais d'immunisation contre des trypanosomes pathogènes. Trypano-Toxines. Bull. Soc. Path. Exot. 6: 176-181, 1913.
- 19 - MARR, J.S. & PRIKE, E. H. - The protection of mice by "Corpus Christi" strain when challenged with "Brasil" strain. J. Parasit. 53: 657-659, 1967.
- 20 - MAYER, M. & ROCHA LIMA, H. - Zum Verhalten von "Schizotrypanum cruzi" in Warm Blutern and Artropoden. Arch. Schiffs. U. Tropenhyg. 18: 101-136, 1914.
- 21 - MENEZES, H. - I. The use of adjuvants in the vaccinations of mice with lyophilized "Trypanosoma cruzi". Hospital 68: 1341-1346, 1965.
- 22 - MENEZES, H. - H. O emprego de adjuvantes na vacinação de camundongos com "Trypanosoma cruzi". Rev. Bras. Med. 22: 536-538, 1965.
- 23 - 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.
- 24 - 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.
- 25 - MENEZES, H. - The avirulence of the cultivated "Y" strain of "Trypanosoma cruzi". IV. The effect of immunosuppressive agents in mice. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 5: 213-233, 1971.
- 26 - MENEZES, H. & RIBEIRO, R. - The avirulence of the cultivated "PF" of "Trypanosoma cruzi". V. The evaluation of parasitologic tests after vaccination of different animal species. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 6: 41-48, 1972.
- 27 - MUNIZ, J.; NÓBREGA, G. & CUNHA, E. N. - Ensaios de vacinação preventiva e curativa nas infecções pelo "S. cruzi". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 44: 529-541, 1946.
- 28 - NORMAN, L. & KAGAN, G. Immunologic studies on "Trypanosoma cruzi". Acquired immunity in mice infected with avirulent american strain of "T. cruzi". J. Infect. Dis. 107: 168-174, 1960.
- 29 - NUSSENZWEIG, V.; KLOETZEL, J. & DEANE, L. M. - Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of "T. cruzi". Exp. Parasit. 14: 233-239, 1963.
- 30 - PIZZI, T. & PRAGER, R. - Inmunidad a la sobreinfección inducida mediante cultivos de "T. cruzi" de virulencia atenuada. Bol. Inf. Parasit. Chile 17: 20-21, 1967.
- 31 - PIZZI, T. & PRAGER, R. - Estabilidad de la virulencia de una cepa de "Trypanosoma cruzi" por pasajes seriadas en ratones de constitución genética uniforme. Análisis cuantitativo del curso de la infección. Biológica 16: 17-3-9, 1953.
- 32 - RUBIO, M. D. - Estudios de los factores que intervienen en la virulencia de una cepa de "Trypanosoma cruzi". Acción de la cortisona en la capacidad de invasión y multiplicación del parásito. Biológica, 20: 89-105, 1954.
- 33 - RUBIO, M. D. - Natural and acquired immunity against "Trypanosoma cruzi" in the hamster (Cricetus auratus). Biológica, 27: 28-9, 111, 1959.
- 34 - SANDERS, A. & WALLACE, L. C. - Immunization of rats with irradiated "T. lewisi". Exp. Parasit. 15: 501-504, 1966.
- 35 - SEAH, S., MARSDEN, P. D. - The protection of mice against a virulent strain of "Trypanosoma cruzi" by previous inoculation with an avirulent strain. Annals of Tropical Medicine Parasitology, 63: 111-114, 1969.
- 36 - SENECA, H. - Current status of immunization of laboratory animals with "T. cruzi" lipopolysaccharide. 5th Int. Trop. Med. & Malaria Techn. Abstracts & Reviews, 36: 1, 1968.
- 37 - SENECA, H. & PFER, P. - Immunobiological properties of Chagas toxin (lipopolysaccharide). Trans. Roy. Soc. Med. & Hyg. 60: 610-620, 1966.
- 38 - SOLTYS, M. A. - Immunity in Trypanosomoses. Immunization of animals with dead Trypanosomas. Parasitology, 54: 585-591, 1964.
- 39 - SOUZA, M. C. M. - Estudos dos mecanismos imunológicos em camundongos

- inoculados com "*Leptomonas pessoai*" e da susceptibilidade desses animais à infecção por "*Trypanosoma cruzi*". Rev. Pat. Trop. 3: 291-332, 1974.
- 40 - SOUZA, M. C. M. & ROITMAN, I. - Protective effect of "*Leptomonas pessoai*" against the infection of mice by "*Trypanosoma cruzi*". Rev. Microbiol. 2: 187-189, 1971.
- 41 - TAGLIAFERRO, W. H. & TAGLIAFERRO, L. G. - The resistance of different hosts to experimental Trypanosome infections, with special reference to a new method of measuring this resistance. Am. J. Hyg. 2: 264-319, 1922.