

## ALGUNS ASPECTOS DA IMUNIDADE ADQUIRIDA EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Z. BRENER (1)

### RESUMO

Foi observada sólida imunidade cruzada em camundongos albinos experimentalmente inoculados com duas amostras de *T. cruzi* que diferem entre si morfológica e biologicamente (amostras "FL" e "Berenice") e reinoculados na fase crônica da doença. Formas largas típicas da cepa "FL" foram recuperadas em animais na fase crônica da doença provocada por amostra "Berenice" e reinoculados com amostra "FL"; êsse fato demonstra que os tripanosomas da reinoculação podem sobreviver aos mecanismos imunitários da fase crônica e que a premunicação se exerce tanto em relação aos parasitas da infecção original como aos reinoculados.

### INTRODUÇÃO

Em trabalhos publicados anteriormente BRENER & CHIARI<sup>3</sup>, BRENER<sup>2</sup>, tivemos ocasião de estudar comparativamente várias amostras do *T. cruzi* e demonstrar que as mesmas apresentam diferenças, às vezes bastante acentuadas, no que se refere à morfologia das formas sangüíneas, comportamento em meios de cultura, parasitemia e mortalidade em camundongos.

No presente trabalho são feitas algumas observações sobre a imunidade cruzada em camundongos albinos experimentalmente inoculados com as amostras FL e Berenice anteriormente descritas.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### *Amostras de T. cruzi*

Berenice — cepa isolada, através de xenodiagnóstico, da paciente considerada como sendo o primeiro caso agudo da doença de CHAGAS descrito por CARLOS CHAGAS (SALGADO & col.<sup>13</sup>). Nessa amostra, como já foi referido BRENER<sup>2</sup>, predominam, de maneira acentuada, as formas delgadas do parasita.

FL — cepa isolada de um exemplar de *Triatoma infestans* encontrado naturalmente infetado no Rio Grande do Sul, BRENER<sup>2</sup>. Nessa amostra predominam as formas anormalmente largas já descritas.

#### *Contagem de tripanosomas*

A estimativa do número de tripanosomas no sangue dos animais infetados e nos inóculos usados foi feita de acordo com técnica descrita anteriormente, BRENER<sup>1</sup>.

#### *Obtenção de animais na fase crônica da doença de CHAGAS*

Camundongos albinos machos pesando 18-20 g eram inoculados com cerca de 100.000 formas sangüíneas do *T. cruzi* e, a partir do dia seguinte à inoculação, tratados com 10 doses consecutivas de 100 mg/kg, dadas por via oral, de 5-morfolinometil-3-(5-nitrofurfurilideno-amino)-2-oxazolidone ("Furaladone"). A partir do 20.º dia de inoculação eram realizados, repetidamente, exames de sangue a fresco nos animais, sendo selecionados, para as experiências posteriores, aqueles nos quais o exame era positivo. De

(1) Instituto Nacional de Endemias Rurais, Belo Horizonte, MG, Brasil

TABELA I

Número de tripanosomas em 5 mm<sup>3</sup> de sangue em camundongos na fase crônica reinoculados com amostras homóloga e heteróloga (5.000 tripanosomas/g pêso), em animais normais inoculados com as amostras FL e Berenice (5.000 tripanosomas/g pêso) e em animais na fase crônica (amostra FL)

Experiência	Dias após inoculação					
	4	7	8	9	10	11
Camundongos em fase crônica (amostra Berenice) reinoculados com amostra FL	0	70	0	0	0	0
	0	0	70	0	70	0
	70	0	0	0	0	0
	70	0	0	0	0	0
	0	0	70	0	0	0
	0	140	0	0	0	0
Camundongos normais inoculados com amostra FL	140	1050	5880	9450	11200	18620
	210	420	2100	5250	5320	6860
	70	980	1750	4900	10850	10850
	70	910	5950	3080	2660	1400
	140	1470	4760	5250	7280	14560
	70	910	3010	1960	5640	3080
Camundongos em fase crônica (amostra Berenice) reinoculados com amostra Berenice	140	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	70	70	0	70	0	0
	0	70	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	70	70	0	0
Camundongos normais inoculados com amostra Berenice	3010	13040	2590	3710	5180	1260
	2590	35000	23800	4690	2940	770
	2240	3430	2450	210	700	980
	1470	14770	6300	12110	7770	6090
	3220	22400	28080	3290	1750	1050
	910	8620	11200	910	6020	1120
Contrôle da fase crônica de camundongos inoculados com amostra Berenice	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	70
	0	0	0	70	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

modo geral a parasitemia após o tratamento é de baixa intensidade e transitória, passando os animais à fase crônica da doença. Esse procedimento é semelhante àquele descrito em trabalho anterior, BRENER & CHIARI<sup>4</sup>.

Em alguns grupos de animais a fase crônica foi induzida através da inoculação de formas de cultura, vivas, do *T. cruzi*. Culturas em meio líquido "LIT", CAMARGO<sup>6</sup>, FERNANDES & CASTELLANI<sup>7</sup>, com 10 dias de crescimento foram usadas, injetando-se uma única vez os animais, por via intraperito-

neal, com cerca de 0,5 ml da suspensão de flagelados.

#### *Experiências de imunidade*

Os animais inoculados com a amostra Berenice e tratados com Furaltone foram mantidos no laboratório até o 53.º dia de infecção quando, então, foram reinoculados com, respectivamente, 5.000 tripanosomas sanguíneos por grama de pêso das amostras Berenice e FL; um terceiro grupo de animais na fase crônica foi mantido como con-

TABELA II

Número de tripanosomas em 5 mm<sup>3</sup> de sangue em camundongos na fase crônica reinoculados com amostras homóloga e heteróloga (5.000 tripanosomas/g pêso), em animais normais inoculados com as amostras FL e Berenice (5.000 tripanosomas/g pêso) e em animais na fase crônica (amostra Berenice)

Experiência	Dias após inoculação					
	4	7	8	9	10	11
Camundongos em fase crônica (amostra FL) reinoculados com amostra Berenice	140	70	0	70	0	0
	630	3360	2870	1260	70	0
	140	70	70	0	70	0
	210	140	0	0	0	0
	140	0	70	70	0	70
	140	70	70	0	0	140
Camundongos normais inoculados com amostra Berenice	1890	7000	16520	3150	210	+
	980	29400	9660	1540	4900	8050
	840	7700	1050	490	140	+
	1750	16100	21000	280	4200	4760
	1610	9800	4690	4200	3500	8190
	140	3850	24080	3500	1120	1260
Camundongos em fase crônica (amostra FL) reinoculados com amostra FL	210	70	0	70	140	70
	0	70	140	70	70	70
	70	70	210	70	0	0
	0	140	770	2030	2590	3010
	0	70	140	70	0	0
	0	0	70	70	0	0
Camundongos normais inoculados com amostra FL	770	2660	5530	2030	8680	5320
	280	1120	1750	10360	10360	14700
	840	1190	9850	2380	2170	23800
	420	980	1470	2450	7840	+
	560	560	16240	17150	14000	22400
	210	2380	5880	12810	9850	10850
Contrôle da fase crônica de camundongos inoculados com amostra FL	140	70	210	0	70	0
	210	0	0	0	0	0
	350	210	140	70	70	490
	0	0	70	0	0	70
	70	70	70	140	140	140
	980	840	700	770	1890	840

trôle, não sendo submetido à reinoculação. Dois outros grupos de animais normais, do mesmo sexo e pêso que os usados para as experiências de imunidade foram também inoculados com 5.000 tripanosomas por grama de pêso.

Esquema semelhante de reinoculações e inoculações foi usado para os animais inoculados com amostra FL e tratados com "Furaltadone", mas, nesse caso, os animais foram reinoculados no 89.º dia de infecção.

Os animais inoculados com formas de cultura foram mantidos em laboratório até o

90.º dia de inoculação, quando foram, então, submetidos às reinoculações com amostras homóloga e heteróloga.

*Recuperação dos tripanosomas em animais na fase crônica reinoculados com amostra heteróloga*

Alguns dos animais na fase crônica produzida por amostra Berenice e reinoculados com amostra FL foram, 25 dias após a reinoculação, sacrificados e o seu sangue injetado em camundongos jovens normais; quan-

TABELA III

Número de tripanosomas em 5 mm<sup>3</sup> de sangue em camundongos na fase crônica induzida por inoculação de formas de cultura e que foram reinoculados com 5.000 tripanosomas/g pêso de cepas heterólogas. Exames realizados no 7º dia de inoculação

Nº	Camundongos em fase crônica (amostra FL) reinoculados com amostra Berenice	Camundongos normais inoculados com amostra Berenice	Camundongos em fase crônica (amostra Berenice) reinoculados com amostra FL	Camundongos normais inoculados com amostra FL
1	0	17.500	0	27.160
2	70	12.600	0	43.400
3	0	6.160	210	22.400
4	0	7.070	0	23.870
5	0	6.580	0	72.800
6	0	7.000	0	8.540
7	0	22.400	70	23.100
8	0	20.720	210	30.800

do o exame de sangue a fresco tornou-se positivo foi feita nova subinoculação, sendo então feito um estudo da morfologia dos parasitas através de coloração de May-Grünwald-Giemsa e desenho em câmara clara.

RESULTADOS

Nas Tabelas I e II estão expostos os resultados obtidos com as reinoculações de amostras homólogas e heterólogas de *T. cruzi* em animais inoculados com as cepas FL e Berenice, nos quais se induziu, por tratamento, a fase crônica da doença. Observa-se nítida imunidade em relação às reinoculações com as cepas homólogas e heterólogas. Na Tabela III estão expostos os resultados obtidos com as reinoculações, com cepas heterólogas, em camundongos na fase crônica induzida por inoculações de formas de cultura, observando-se igualmente sólida imunidade.

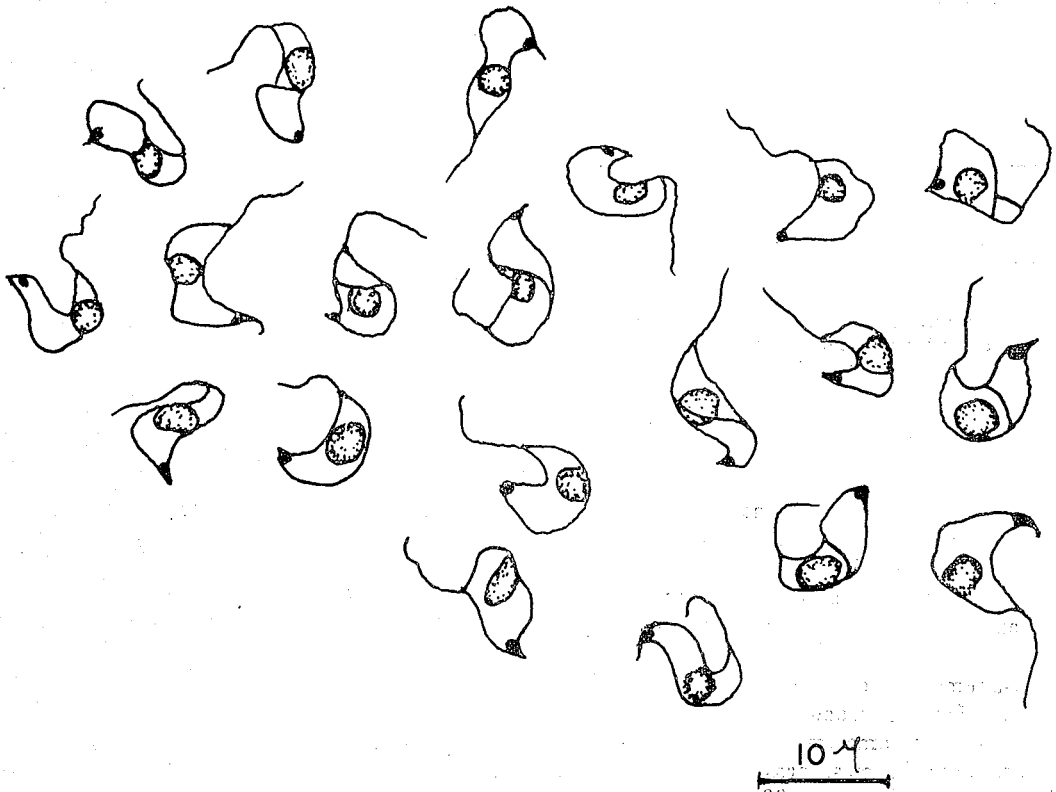


Fig. 1 — Formas largas, típicas da amostra "FL" recuperadas de animais na fase crônica (inoculados com amostra "Berenice") reinoculados com amostra "FL". Formas obtidas no 7º dia de infecção.

Na Fig. 1 estão representadas algumas formas largas típicas da amostra FL, BRENER & CHIARI<sup>3</sup>, BRENER<sup>2</sup>; essas formas foram recuperadas de animais na fase crônica (inoculados com amostra Berenice) reinoculados com amostra FL. As formas da Fig. 1 correspondem a tripanosomas encontrados no sangue dos camundongos aos 7 dias de inoculação.

#### DISCUSSÃO

Desde 1913 (BRUMPT<sup>5</sup>) sabe-se que animais na fase crônica da doença de CHAGAS apresentam imunidade a reinfecções. Uma revisão mais detalhada da literatura relacionada a êsse problema foi realizada por PIZZI<sup>12</sup>. Mais recentemente, NORMAN & KAGAN<sup>10</sup>, KAGAN & NORMAN<sup>8</sup> e BRENER<sup>1</sup> estudaram alguns aspectos particulares da citada imunidade. De modo geral, os animais na fase crônica não apresentam, quando reinoculados, elevações significativas do número de parasitas circulantes ou aquelas parasitemias características da fase aguda. Como assinalou PIZZI<sup>12</sup>, êsse mecanismo de resistência é eminentemente celular embora possa ser admitida a participação de anticorpos que sensibilizariam previamente os parasitas a serem fagocitados. A imunidade adquirida na doença de CHAGAS experimental pode ser estudada em animais que sobreviveram à fase aguda BRUMPT<sup>5</sup>, animais inoculados com formas de cultura, PIZZI<sup>12</sup> e, finalmente, naqueles tratados com drogas de ação supressiva PIZZI<sup>12</sup>, BRENER & CHIARI<sup>4</sup>. Em um estudo anterior tivemos oportunidade de demonstrar que um tratamento supressivo de curta duração induz a fase crônica, que pode, então, ser obtida em condições padronizadas. Embora durante o tratamento, que se inicia no dia seguinte à inoculação, a parasitemia não seja frequentemente patente, os animais apresentam fase crônica com características indistinguíveis daquelas observadas em camundongos que sobrevivem a uma infecção aguda e por isso constituíram o material preferencial para essa investigação.

Em trabalhos anteriores, BRENER<sup>2</sup>, BRENER & CHIARI<sup>3</sup>, tivemos oportunidade de demonstrar a diversidade morfológica e biológica de algumas amostras de *T. cruzi*.

Essas diferenças, entretanto, como se demonstra no presente trabalho, não são suficientes para alterar a imunidade cruzada comumente existente em infecções chagásicas experimentais com outras cepas homólogas ou heterólogas. Êsses resultados concordam com aqueles obtidos mais recentemente por NUSSENZWEIG & col.<sup>11</sup> que, através de testes de proteção, não puderam distinguir amostras de *T. cruzi* imunologicamente distintas.

O fato de que a amostra FL apresenta nítida predominância de formas anormalmente largas e a possibilidade da recuperação de tais formas em animais com fase crônica provocada por amostra Berenice que haviam sido reinoculados com cepa FL demonstram a persistência dos tripanosomas reinoculados. Portanto, empregando-se as mencionadas formas como "marcador" foi possível demonstrar que o fenômeno da imunidade não-esterilizante ("premunição") se exerce tanto em relação aos tripanosomas da infecção original como aos reinoculados que, não sendo destruídos, passam também a dar origem a parasitemias subpatentes características da fase crônica. KAGAN & NORMAN<sup>9</sup> já haviam chegado a conclusão semelhante embora de modo indireto. Êsses Autores reinocularam, com uma cepa altamente virulenta, camundongos previamente inoculados com tripanosomas de amostra norte-americana pouco virulenta e, em seguida, fizeram subinoculações em animais normais usando sangue dos camundongos que sobreviveram à hiperinfecção; como, nas passagens que foram feitas, um número cada vez maior de animais morria em virtude da infecção, os Autores concluíram que provavelmente os tripanosomas da amostra altamente virulenta sobreviveram à reinoculação e tiveram a sua virulência original gradativamente restabelecida. KAGAN & NORMAN<sup>9</sup> sugerem, inclusive, que a aparente diminuição inicial da virulência tenha sido devida à transferência passiva de anticorpos nas subinoculações. Os nossos dados, de natureza diferente, confirmam a persistência dos tripanosomas reinoculados. Êsse fato, que poderia eventualmente ocorrer no homem, deve ser levado em consideração nas experiências de caracterização de diferentes amostras de *T. cruzi*.

SUMMARY

*Some aspects of the acquired immunity in experimentally infected mice with Trypanosoma cruzi*

Strong cross immunity has been observed in albino mice experimentally infected with two morphologically and biologically different strains of *Trypanosoma cruzi* (strains FL and Berenice). Challenge exposure to heterologous strains was performed on animals in the chronic phase produced by suppressive drug action or inoculation of culture forms. Typical stout forms found in FL strain were recovered from mice infected with Berenice strain and submitted to challenge infection with FL strain; this fact demonstrates that trypanosomes from a superimposed challenge infection may survive and develop by the side of the original strain.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRENER, Z. — *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas*. Tecc. Belo Horizonte, 79 pp., 1961.
2. BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 59:19-26, 1965.
3. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:220-224, 1963.
4. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Observações sobre a fase crônica da doença de Chagas experimental no camundongo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:128-132, 1963.
5. BRUMPT, E. — Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundatus*; rôle régulateur des hôtes intermédiaires; passage à travers la peau. *Bull. Soc. Path. Exot.* 6:172-176, 1913.
6. CAMARGO, E. P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I — Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:93-100, 1964.
7. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasit.* 18:195-202, 1966.
8. KAGAN, I. G. & NORMAN, L. — Immunological studies on *Trypanosoma cruzi*. III — Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North-American strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 108:213-217, 1961.
9. KAGAN, I. G. & NORMAN, L. — Immunological studies on *Trypanosoma cruzi*. IV — Serial transfer of organisms from immune to nonimmune mice. *J. Parasit.* 48:584-588, 1962.
10. NORMAN, L. & KAGAN, I. G. — Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. II — Acquired immunity in mice infected with avirulent strains of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 107:168-174, 1960.
11. NUSSENZWEIG, V.; KLOETZEL, J. & DEANE, L. M. — Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasit.* 14:233-239, 1963.
12. PIZZI, T. — *Inmunología de la Enfermedad de Chagas*. Universidad de Chile, 183 pp., 1957.
13. SALGADO, J. A.; GARCEZ, P. N.; OLIVEIRA, C. A. & GALIZZI, J. — Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:330-336, 1962.

Recebido para publicação em 2/12/1966.