

OBSERVAÇÕES SÔBRE A FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL NO CAMUNDONGO

Z. BRENER e E. CHIARI

RESUMO

Administrando, a partir do dia seguinte à inoculação, durante 10 dias consecutivos, um composto de atividade supressiva, os AA. conseguiram, em um grande número de camundongos inoculados com cepa altamente virulenta de *Trypanosoma cruzi*, uma infecção de caráter crônico com parasitemia discreta ou subpatente e pequena mortalidade dos animais. De 275 camundongos inoculados, 96% apresentaram exame de sangue positivo a fresco após o tratamento. Parasitos foram recuperados, por subinoculação, de camundongos com infecção crônica evoluindo há 9 meses e 1 ano. Animais cuja fase crônica foi induzida da maneira descrita foram reinoculados, após 9 meses, apresentando sólida imunidade às hiperinfecções. A administração de cortisona nessa fase não agrava o curso da infecção chagásica, ao contrário do que ocorre na fase aguda.

INTRODUÇÃO

A maioria dos estudos experimentais realizados na doença de Chagas, em camundongos, tem sido levada a efeito na fase aguda da doença quando o número de parasitos é muito grande e o desfêcho da infecção é, em geral, fatal. Entretanto, essa fase da doença apresenta particularidades biológicas peculiares que diferem daquelas encontradas na doença crônica que se caracteriza, essencialmente, por uma infecção com parasitemia submicroscópica que reflete a imunidade relativa do hospedeiro. Os dois fatores citados, ou seja, o decurso fatal da infecção aguda e a escassez de parasitos na infecção crônica dificultam o estudo dessa última fase que tanta importância apresenta do ponto de vista humano e experimental.

No presente trabalho é descrita uma técnica que permite, de um modo relativamente fácil, induzir a fase crônica da doença de Chagas em camundongos inoculados com uma amostra de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta, assim como são estudados alguns aspectos dessa forma da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram usados, para as experiências, a amostra "Y" de *Trypanosoma cruzi* descrita por PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG⁴ e camundongos albinos fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas de Belo Horizonte do Instituto Nacional de Endemias Rurais.

A contagem de tripanosomas foi feita segundo técnica descrita por BRENER¹, sendo todos os resultados expressos em número de tripanosomas por 5 mm³ de sangue. Para a indução da fase crônica, camundongos albinos pesando 18 a 20 g eram inoculados, por via intraperitoneal, com cerca de 75.000 tripanosomas, sendo administrados, a partir do dia seguinte à inoculação, diariamente, por via oral, durante 10 dias consecutivos, 100 mg/kg de 5-morfolinometil-3-(5-nitrofurilideno-amino)-2-oxazolidone ("Furaltadone"). Para o estudo do decurso da infecção eram feitas contagens, do modo descrito, diariamente ou em dias alternados.

Nos animais em fase crônica a persistência da infecção inicial era comprovada sacri-

Trabalho do Centro de Pesquisas de Belo Horizonte do Instituto Nacional de Endemias Rurais.

ficando-se grupos de camundongos em diferentes épocas e subinoculando-se o sangue em dois camundongos receptores com 14 a 16 g. A partir do 5.º dia após a subinoculação, eram feitos exames de sangue a fresco que se prolongavam até pelo menos 30 dias.

Para os estudos de imunidade a hiperinfecções, animais tratados segundo o esquema descrito foram, em períodos variáveis após a comprovação da infecção inicial, reinoculados com cerca de 4.000 formas sanguíneas do *T. cruzi* por g de peso. Animais testemunhas do mesmo sexo e peso receberam o mesmo inóculo. Exames de sangue a fresco foram feitos diariamente ou em dias alternados a fim de surpreender uma nova fase aguda.

Para a avaliação da atividade de drogas na fase crônica os animais eram tratados durante 10 dias consecutivos e sacrificados cerca de 30 dias após o término da medicação, sendo o seu sangue total subinoculado em dois camundongos pesando 14-16 g. Igualmente, a partir do 5.º dia eram feitos exames de sangue a fresco para comprovação do parasitismo.

RESULTADOS

Curso da infecção — Como se pode observar no Quadro I, a administração do medicamento produz uma infecção que poderíamos caracterizar como sendo inicialmente crônica, já que os animais inoculados e tratados do modo descrito apresentam, após o tratamento, parasitemia discreta e irregular com mortalidade muito reduzida. Em alguns animais apenas em uma única ocasião foram encontrados parasitos, sendo negativos todos os demais exames de sangue a fresco realizados.

Comprovação da infecção — Na figura 1 estão expostos os resultados obtidos no exame de sangue a fresco de 50 camundongos tratados a partir do dia seguinte à inoculação e examinados a partir do 12.º dia de infecção. Como se pode observar, a maioria dos camundongos apresentou tripanosomas no sangue entre o 15.º e o 20.º dias após a inoculação, sendo, pois, esse intervalo o preferido para a comprovação da infecção.

Entre 275 camundongos inoculados com 75.000 tripanosomas e examinados do modo descrito, 264 ou seja 96% foram positivos ao exame de sangue a fresco realizado durante esse período.

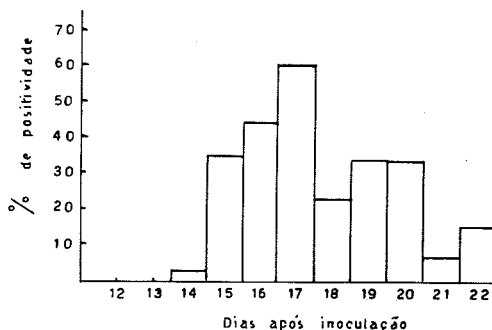


Fig. 1 — Positividade do exame de sangue a fresco em 50 camundongos inoculados com cerca de 75.000 tripanosomas, tratados a partir do dia seguinte à inoculação e examinados a partir do 12º dia de infecção.

Sobrevida dos animais — Embora a sobrevida variasse nas diferentes séries de animais inoculados, observou-se que após 1 ano, cerca de 25% dos animais apresentavam-se vivos, número que nos parece satisfatório para a condução de trabalhos na fase crônica da doença.

Persistência do parasito na fase crônica — Embora a cura espontânea da infecção chagásica ainda não tenha sido assinalada e, pelo contrário, as evidências sejam de que ela não ocorra, achamos interessante procurar reisolar os parasitos da infecção primitiva no sentido de demonstrar a persistência da infecção. Com essa finalidade 25 camundongos inoculados e tratados há 9 meses foram sacrificados, sendo o seu sangue subinoculado em camundongos jovens normais; em 24 animais foi possível demonstrar a persistência da infecção inicial através do aparecimento de fase aguda nos animais receptores. Em pelo menos 5 animais, tripanosomas foram recuperados após 1 ano da inoculação.

Imunidade na fase crônica — A fim de verificar a existência de imunidade nos animais em fase crônica, 8 camundongos com infecção datando de 6 a 9 meses foram re-

QUADRO I

Curso da infecção chagásica (nº de tripanosomas por 5 mm³) em camundongos inoculados com cerca de 75.000 tripanosomas e tratados, a partir do dia seguinte à inoculação, com 100 mg/kg de "Furaltadone", por via oral, durante 10 dias consecutivos

| Nº de camundongos | Dias após a inoculação | | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------|----|----|----|-----|-----|----|----|----|----|-----|
| | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
| 1 | — | — | — | — | — | 70 | — | — | — | — | — |
| 2 | — | — | — | 35 | — | — | — | — | 70 | — | 70 |
| 3 | — | — | — | — | — | 70 | — | — | — | — | — |
| 4 | — | — | — | 70 | 105 | — | — | — | — | — | — |
| 5 | — | — | — | — | 35 | 35 | — | 35 | 35 | — | 35 |
| 6 | — | — | — | 35 | 140 | 35 | 35 | — | — | — | — |
| 7 | — | — | — | 35 | — | 35 | — | — | — | — | 105 |
| 8 | — | — | — | — | — | 35 | — | — | — | — | — |
| 9 | — | — | — | 35 | — | 105 | — | — | — | — | 35 |
| 10 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

QUADRO II

Curso da infecção (nº de tripanosomas por 5 mm³) em camundongos tratados com cortisona (0,5 mg/20 g, via intramuscular) a partir do 58º dia de infecção

| Nº de camundongos | Dias após a inoculação | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------|----|----|----|----|-----|------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|----|-----|
| | 46 | 50 | 53 | 55 | 56 | 58 | | 59 | 60 | 62 | 61 | 65 | 66 | |
| 1 | — | — | — | — | — | — | Início do tratamento com cortisona | — | — | — | — | — | 70 | |
| 2 | — | 35 | 70 | — | — | — | | — | — | 70 | 175 | — | 70 | |
| 3 | — | — | — | — | — | — | | — | — | — | — | — | — | |
| 4 | — | — | 35 | — | — | — | | — | — | — | — | — | — | 35 |
| 5 | — | — | — | — | — | — | | — | — | — | 35 | — | — | 105 |
| 6 | — | — | 35 | — | — | — | | — | 35 | — | — | — | — | — |
| 7 | — | — | — | — | — | — | | — | — | — | — | — | — | — |
| 8 | — | — | — | 70 | — | 105 | | — | 70 | 105 | 140 | 105 | — | 105 |
| 9 | — | — | — | — | — | — | | — | — | — | — | — | — | — |
| 10 | — | — | — | — | — | 35 | | — | — | — | — | — | 35 | 70 |

inoculados com cerca de 4.000 tripanosomas por g de pêso, por via intraperitoneal. Exames de sangue a fresco, feitos repetidamente, não evidenciaram a presença de tripanosomas nos animais reinoculados, o que demonstra a existência de sólida imunidade a hiperinfecções.

Administração de cortisona na fase crônica — Considerando que a administração de cortisona agrava consideravelmente o curso da infecção chagásica aguda, resolvemos administrar essa substância na dose de 0,5 mg/20 g, por via intramuscular, em 10 animais nos quais foi induzida a fase crônica e que se apresentavam com 58 dias de infecção, durante 10 dias consecutivos. Exames de sangue a fresco realizados antes e durante a administração do medicamento, mostraram que não houve alteração sensível nos níveis de parasitemia em consequência da administração da droga (Quadro II).

Tratamento na fase crônica — A fim de verificar a exequibilidade de uma triagem de drogas na fase crônica, animais inoculados há 9 meses foram divididos em grupos de 5 e tratados, durante 10 dias consecutivos, com 5 compostos de diferentes estruturas químicas que se revelaram inativas na fase aguda da doença. Subinoculação do sangue dos animais tratados foi positiva na totalidade dos camundongos.

DISCUSSÃO

Pizzi⁴ empregou um método de imunização que consistia em inocular tripanosomas virulentos e tratar simultaneamente os animais com primaquina. Com essa técnica os animais tratados sobreviviam indefinidamente, apresentando discretas parasitemias; entretanto, não foi feito um estudo sistematizado do curso da infecção, sobrevivência, técnica de comprovação da infecção residual, etc. Amostras pouco virulentas podem também ser usadas para a obtenção de fase crônica em camundongos, mas, nesse caso, de um modo geral, os dados são dificilmente controláveis em virtude da escassa parasitemia. Animais que sobrevivem espontaneamente de uma infecção por amostra virulenta podem ser empregados em estudos de fase crônica, sobretudo imunológicos, mas, nesse

caso, somente um pequeno número de animais pode ser obtido. Com a técnica descrita, que se aproxima daquela empregada inicialmente por Pizzi⁴, a fase crônica pode ser induzida em um grande número de animais, os quais sobrevivem durante um período suficientemente longo, permitindo, assim, a realização dos diferentes estudos que se fizerem necessários.

Uma das desvantagens do método descrito reside no fato de que os animais não passam pela fase aguda e, portanto, não reproduzem, integralmente, as condições normais de evolução da doença. Entretanto, as características gerais da infecção chagásica crônica estão conservadas, entre as quais a parasitemia subpatente e a imunidade. Quanto a esse último aspecto convém destacar o fato de que, aparentemente, o pleno desenvolvimento da parasitemia da fase aguda não seja indispensável ao aparecimento da imunidade a superinfecções. A ausência de um aumento sensível da parasitemia como consequência da administração de cortisona, ao contrário do que acontece na fase aguda (Pizzi & col.⁵; RUBIO⁶, RUBIO⁷), sugere que a cortisona interfira sobre mecanismos que estão presentes apenas nas fases iniciais da infecção chagásica experimental.

A exequibilidade de uma triagem de drogas em camundongos na fase crônica ficou demonstrada pela positividade da subinoculação nos animais tratados, confirmando, assim, dados expostos em trabalho anterior.

Um estudo mais detalhado dos aspectos patológicos e sorológicos dos animais submetidos ao esquema descrito seria altamente desejável, a fim de elucidar certos aspectos ainda obscuros da fase crônica da doença.

SUMMARY

Notes on the chronic phase of experimental Chagas disease of mice.

A chronic infection presenting either a slight or a subpatent parasitemia was obtained in mice experimentally infected with a virulent strain of *T. cruzi* and treated, from the day after inoculation on, with 10 consecutive doses of a suppressive drug. From 275 mice inoculated and treated in this way,

264 (96%) had positive fresh blood examination after this treatment. Parasites were recovered, through subinoculation, from mice inoculated and treated 9 months and 1 year before. A strong acquired immunity developed in mice in the chronic phase. Unlike the acute phase, the chronic disease was not affected by the administration of cortisone, which did not increase the parasitemia and the mortality.

REFERÊNCIAS

1. BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Belo Horizonte, 1961. Tese.
2. DARMAN, M. — Multiplication du *Trypanosoma cruzi* dans le sang périphérique de la souris par passages successifs: recherche de la prémunition vis-à-vis des souches homologues et heterologues. Ann. Parasitol. hum. & comp. 18:166-179, 1941.
3. DIAS, E. — Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 28:1-110, 1934.
4. PIZZI, T. — Inmunología de la enfermedad de Chagas. Santiago, Universidad de Chile, 1957.
5. PIZZI, T.; RUBIO, M.; PRAGER, R. & SILVA, R. — Acción de la cortisona en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*: comunicación preliminar. Bol. Inf. parasit. chil. 7:22-24, 1952.
6. RUBIO, M. D. — Estudio 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 parasito. Biologica 20:89-125, 1954.
7. RUBIO, M. D. — Influencia del acetato de cortisona sobre la virulencia y localización tisular de una nueva cepa de *Trypanosoma cruzi*: estudio de la persistencia de los cambios observados. Biologica 21:75-89, 1955.
8. SILVA, L. H. P. da & NUSSENZWEIG, V. — Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia clin. et biol. 20:191-208, 1953.

Recebido para publicação em 25 março 1963.