

## RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRIPANOSOMAS INOCULADOS EM ANIMAIS IMUNES

(Reinoculação com diferentes cepas do *T. cruzi*)

Sonia G. ANDRADE, Maria Luiza CARVALHO, Rozália M. FIGUEIRA e Zilton A. ANDRADE

### RESUMO

Camundongos com infecção crônica pela cepa *Colombiana* do *T. cruzi*, foram reinoculados com tripanosomas virulentos da cepa *Y*, tendo-se observado acentuada resistência a esta segunda infecção, não havendo qualquer modificação na parasitemia nem no quadro histopatológico dos animais que vinham com infecção crônica de longa duração (120 a 270 dias). Procurando verificar se os tripanosomas da cepa *Y* tinham sido completamente destruídos ou não, no animal imune, foram feitas passagens sucessivas em animais recém-nascidos a partir do sangue dos animais reinoculados. Assim foi possível se recuperar a cepa *Y*, a qual foi caracterizada através de várias técnicas. Este trabalho mostra que a resistência adquirida por uma infecção prévia é apenas parcial e que uma infecção determinada por uma cepa, não impede que tripanosomas de outra cepa possam vir a coexistir no mesmo organismo.

### INTRODUÇÃO

Já tem sido demonstrado que animais experimentalmente infetados pelo *Trypanosoma cruzi* desenvolvem mais tarde, resistência a uma infecção por cepa virulenta<sup>2, 7, 9, 12, 14, 16, 19</sup>. Este fato é observado mesmo quando as inoculações são feitas com diferentes cepas do *T. cruzi*<sup>6, 10, 13, 15</sup>. O que acontece então com os novos tripanosomas que são inoculados, se são destruídos na sua totalidade ou apenas parcialmente, é um problema que tem implicações várias e que o presente trabalho se propõe a estudar.

KAGAN & NORMAN<sup>11</sup>, inoculando camundongos com cepa de baixa virulência e depois reinoculando com cepa virulenta, conseguiram recuperar por meio de inoculações sucessivas, tripanosomas dotados de virulência alta, portanto, identificáveis aos que foram reinoculados em animais imunes. BRENER<sup>6</sup>, baseando-se nos diferentes caracté-

res morfológicos de duas cepas, conseguiu identificar tripanosomas que foram inoculados em animais imunes, pela presença de formas muito largas, características da cepa reinoculada. Sabemos entretanto que, para uma precisa caracterização de uma cepa, faz-se conveniente um critério baseado não em um único elemento mas em um conjunto de vários caracteres, como demonstrado em trabalho anterior<sup>3</sup>. Desta maneira decidimos retomar os estudos sobre o destino dos tripanosomas inoculados em animais imunes. Para isto, animais que chegaram à fase crônica de infecção pela cepa *Colombiana* do *T. cruzi*, foram reinoculados com a cepa *Y* cujos caracteres morfológicos são conhecidos<sup>18</sup> e que difere da cepa *Colombiana* também por aspectos biológicos e histopatológicos<sup>1</sup>. Para recuperação da cepa reinoculada e posterior identificação pelo estudo de seus caracteres

morfológicos, biológicos e histopatológicos, foram feitas passagens sucessivas, no sentido de se conseguir a reativação da mesma.

#### MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizados 46 camundongos brancos, pesando entre 15 e 25 g, todos eles sobreviventes a uma infecção pela *cepa Colombiana* do *T. cruzi*, durante prazos variáveis entre 120 e 270 dias. Oito destes animais foram sacrificados para estudo histopatológico da fase crônica da infecção. Os 38 restantes foram submetidos a infecção virulenta pela *Cepa Y* do *T. cruzi* (inóculo: 113.000 tripanosomas em 0,2 ml de sangue citratado). Quinze camundongos intactos foram infetados com o mesmo inóculo para controle da infecção pela *cepa Y*. Dos animais que sofreram reinoculação, 23 foram sacrificados após 7, 10, 13, 14, 29 e 30 dias, para estudo histopatológico.

**Reativação** — Os animais reinoculados restantes, foram sacrificados após 120 dias da reinoculação e o sangue dos mesmos foi inoculado em camundongos recém-nascidos (4 a 4,5 g de peso), com a finalidade de reativar e recuperar a cepa inoculada nos animais resistentes, e a seguir foram feitas passagens sucessivas com 10 dias de intervalo de acordo com a seqüência expressa no Quadro I em que se pôde acompanhar a recuperação dos tripanosomas a partir do inóculo inicial.

**Curvas parasitêmicas** — a partir da 6.<sup>a</sup> passagem a contagem do número de tripanosomas no sangue periférico era feita diariamente entre lâmina e lamínula, tomando-se como padrão o número de tripanosomas em 50 campos microscópicos 40 x 10.

**Estudo morfológico** — Com a finalidade de se estabelecerem as formas de tripanosomas que predominavam em cada dia da infecção, e se obter assim o padrão morfológico da cepa isolada após as passagens sucessivas, foram feitos esfregaços do sangue periférico, diariamente, sendo os mesmos corados pelo método de May Grünwald-Giemsa em solução tamponada bifosfato, pH=7. Em 100 formas tripanosoma, representativas de cada dia de infecção, era feita a percenta-

QUADRO I

Passagem	Pêso do camundongo	Inóculo (*)
1	4 a 4,5 g	Negativo (**)
2	4 a 4,5 g	3.720 tripanosomas
3	4 a 4,5 g	4.960 tripanosomas
4	4 a 4,5 g	132.680 tripanosomas
5	10 a 12 g	24.800 tripanosomas
6	10 a 12 g	127.720 tripanosomas
7	10 a 12 g	22.320 tripanosomas
8	4 a 4,5 g	9.820 tripanosomas
9	10 a 12 g	267.220 tripanosomas
10	10 a 12 g	74.400 tripanosomas
11	10 a 12 g	64.480 tripanosomas

(\*) N.º de tripanosomas em 0,2 ml de sangue citratado

(\*\*) Inóculo obtido dos animais resistentes, após 120 dias da reinoculação.

gem de formas delgadas, largas, muito largas e curtas, classificadas de acordo com critério de BRENER & CHIARI<sup>4</sup> e BRENER<sup>5</sup>.

Os animais sacrificados nos diversos grupos foram fixados em formol a 10% para estudo histopatológico dos diversos órgãos, em cortes corados pela Hematoxilina e eosina.

#### RESULTADOS

1) Os animais com infecção crônica pela *cepa Colombiana* e que foram reinoculados com a *cepa Y* do *T. cruzi*, não mostraram alterações da curva parasitêmica após reinoculação, persistindo a parasitemia em níveis muito baixos, como mostra a Fig. 1. Do ponto de vista das lesões histopatológicas, estas eram idênticas às observadas nos animais com infecção crônica pela *cepa Colombiana*, que não sofreram reinoculação e serão descritas adiante.

2) Os animais controles da infecção crônica pela *cepa Colombiana*, cuja parasitemia

variava entre zero e 1,2 tripanosomas em média, mostravam ao exame histopatológico um processo de miocardite crônica difusa moderada, com infiltração de linfócitos, histiócitos e plasmócitos, sendo raramente encontrados ninhos de leishmânias nas fibras cardíacas; em todos os casos havia lesões de músculo esquelético (Figs. 4 e 5) que variavam de intensidade de caso para caso, constituídas por infiltração mononuclear difusa, que se adensava em focos perivasculares, necrose e regeneração de fibras musculares e presença de raros ninhos de leishmânias no interior das fi-

bras musculares. O tecido adiposo pericárdico, peri-renal, mesentérico, apresentava difuso infiltrado inflamatório crônico e havia lesões vasculares disseminadas com necrose hialina de paredes arteriolares, infiltrado inflamatório peri-vascular ou dissociando as camadas das arteríolas.

3) O grupo controle de infecção pela cepa Y mostrou curva parasitêmica de ascensão rápida, com máximo de parasitemia aos 8 dias (Fig. 1). Houve alta mortalidade dos animais, que sobreviveram apenas até 12 dias.

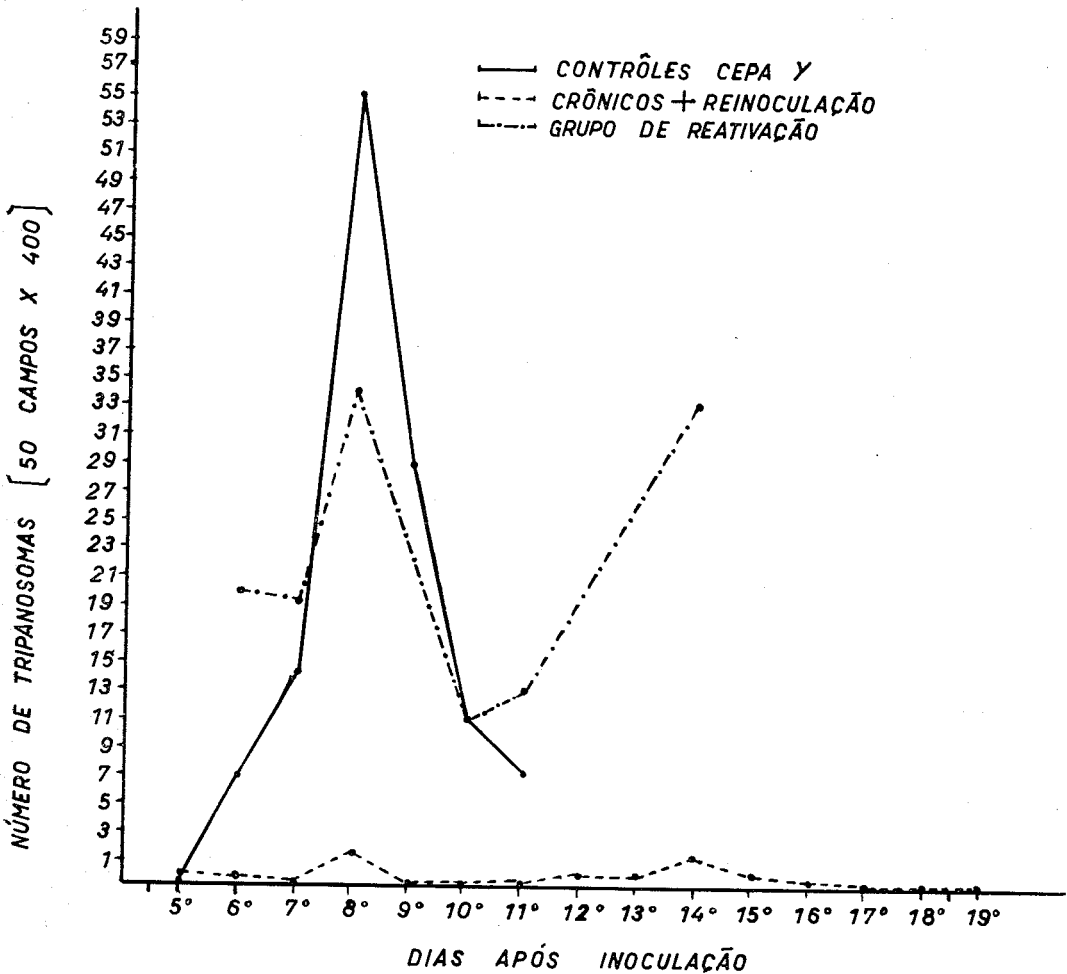


Fig. 1 — Curvas parasitêmicas — O grupo de infecção crônica pela cepa Colombiana não sofreu alteração após reinoculação com a cepa Y. Após reativação (passagens sucessivas), a curva parasitêmica assume aspecto idêntico ao observado com a cepa Y (grupo controle), até 10 dias, com ascensão posterior.

Havia parasitismo intenso de células do SRE ao nível do baço, fígado, tecido adiposo peri-cardíaco e peri-renal, de células do interstício muscular e de fibras musculares lisas do intestino.

4) Grupo de reativação — as passagens sucessivas feitas em camundongos recém-nascidos a partir de animais com infecção crônica pela *cepa Colombiana* e reinoculados com a *cepa Y*, permitiu a obtenção de uma infecção leve que foi se acentuando nas passagens sucessivas, com grandes oscilações dependentes principalmente do peso do animal, como mostra o Quadro I, determinando a partir da 9.<sup>a</sup> passagem, infecção virulenta, determinando curvas parasitêmicas com ascensão precoce e configuração semelhante à observada com o grupo controle de infecção pela *cepa Y*, embora ainda sem atingir os mesmos níveis

(Fig. 1). Também a mortalidade destes animais foi idêntica à observada no grupo controle de infecção pela *cepa Y*, atingindo o máximo aos 12 dias porém com mortalidade total aos 15 dias. O estudo morfológico dos tripanosomas do sangue periférico nestes grupos, Fig. 2, mostrou predominância inicial de formas delgadas, com aumento progressivo do número de formas largas, quadro morfológico êste, característico da *cepa Y*. O estudo histopatológico mostrou acentuado reticulotropismo inicial, idêntico ao quadro observado no grupo controle de infecção pela *cepa Y*.

#### COMENTARIOS

Os resultados do presente trabalho demonstram que tripanosomas reinoculados em camundongos tornados resistentes por uma pré-

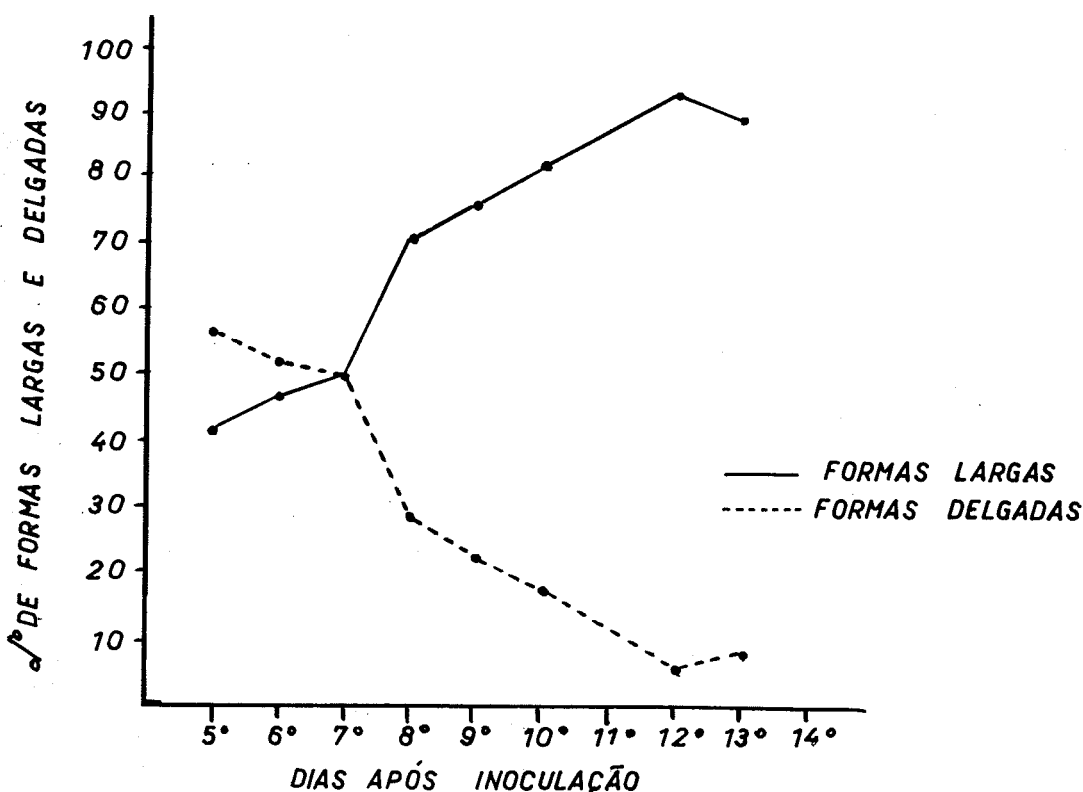


Fig. 2 — Quadro morfológico dos tripanosomas no sangue periférico, no grupo inoculado com as duas cepas, após reativação, vendo-se predominância inicial de formas delgadas. Este quadro é semelhante ao observado com a infecção pela *cepa Y*.

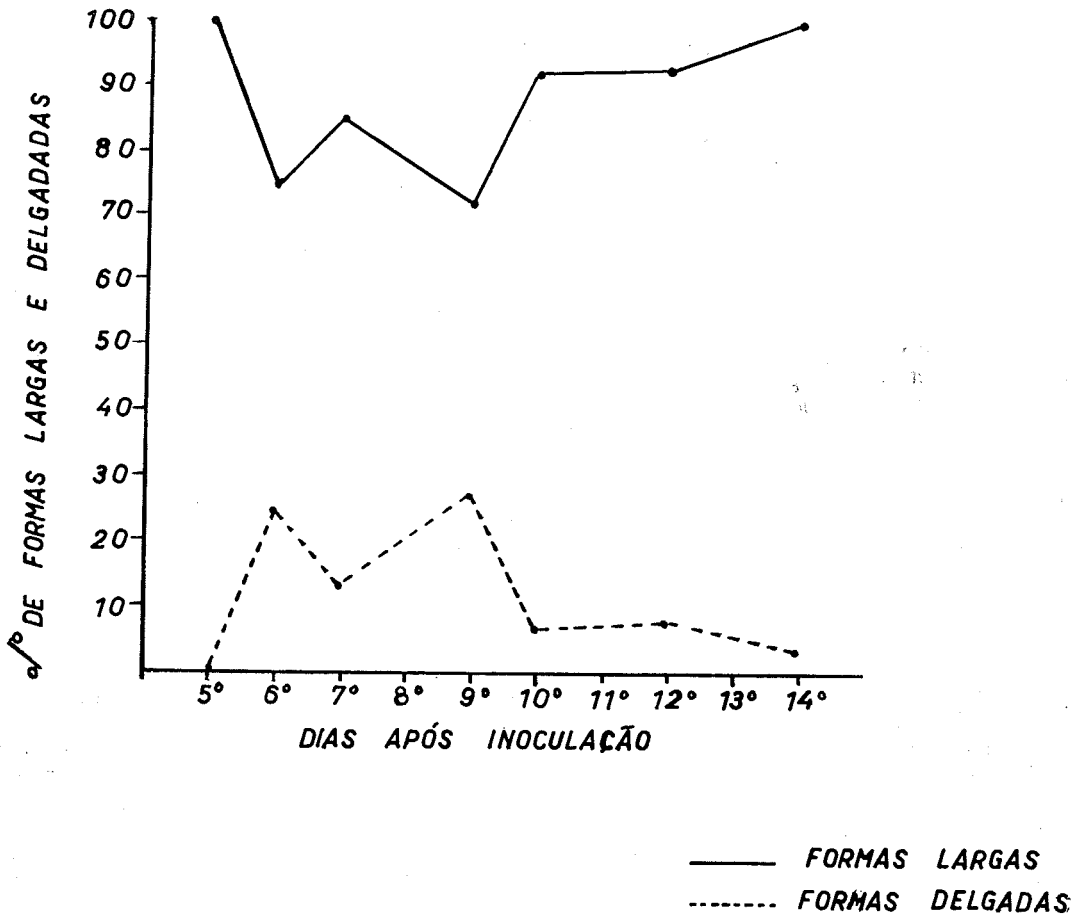


Fig. 3 — Quadro morfológico dos tripanosomas no sangue periférico, característico da cepa *Colombiana*, verificando-se predominância de formas largas em todo o curso da infecção.

via infecção, podem ser recuperados e identificados. A resistência dos animais infetados é um fato demonstrado por numerosos Autores e, no presente trabalho, também se confirmou que os animais com uma infecção crônica de longa duração pela cepa *Colombiana* do *T. cruzi* apresentavam resistência à reinoculação pela cepa Y. Esta resistência foi demonstrada pelo estudo das curvas parasitêmicas que se mantiveram inalteradas em níveis baixos após a infecção virulenta; pela ausência de alterações do quadro histopatológico, não se tendo observado nos animais reinoculados lesões características da fase aguda da infecção; pela ausência de mortalidade dos animais reinoculados, enquanto os

contrôles morreram todos até 12 dias da infecção virulenta.

Apesar de todos os fatos citados, um ponto de grande importância deveria ser melhor esclarecido, isto é, se os tripanosomas reinoculados persistiam no organismo do animal e poderiam ser recuperados. As duas cepas com que os animais estavam inoculados apresentavam diversos caracteres que permitiam a sua diferenciação (1,3) e todos estes caracteres foram levados em conta no sentido de se identificar a cepa reinoculada. A fim de evitar que a cepa inoculada inicialmente (*cepa Colombiana*), fôsse também reativada pelo processo usado, as passagens eram feitas com intervalos curtos (10 dias), prazo sufi-

ciente para a multiplicação da *cepa Y*, porém muito curto para a *cepa Colombiana*, que, como foi demonstrado em trabalhos anteriores<sup>1, 2, 8</sup> somente atinge o seu máximo de parasitemia em torno de 30 dias; mesmo assim em animais que após a reativação sobreviveram até 15 dias já se pôde ver na curva parasitêmica (Fig. 1) início de subida da mesma, indicando que a cepa da infecção inicial também foi reativada, porém a mortalidade determinada pela *cepa Y*, mais virulenta, impediu o seu desenvolvimento. Após o processo de reativação, a cepa cujas características predominaram, determinando alta mortalidade precoce, curvas parasitêmicas precocemente elevadas e reticulotropismo inicial, foi a *cepa Y*, cujo quadro morfológico também foi característico, (Fig. 2) com predominância inicial de formas delgadas, enquanto a *cepa Colombiana* apresenta predo-

minância de formas largas desde o início da infecção (Fig. 3). Isto significa que, embora tendo a sua proliferação limitada por fatores imunitários ainda não determinados, os tripanosomas inoculados em animais imunes permanecem no organismo sob a forma de uma subinfecção, podendo ser reativados, vindo a determinar infecção virulenta, com lesões tissulares características. KAGAN & NORMAN<sup>11</sup> infetaram animais com uma cepa pouco virulenta e em seguida com a *cepa Tulauhen*, dotada de alta virulência e verificaram que a infecção prévia determinava proteção porém que a virulência da cepa reinoculada poderia ser recuperada após passagens sucessivas em camundongos lactentes, atribuindo a fatores imunológicos a menor virulência observada nas passagens iniciais.

A demonstração de que os tripanosomas inoculados em animais resistentes não são total-

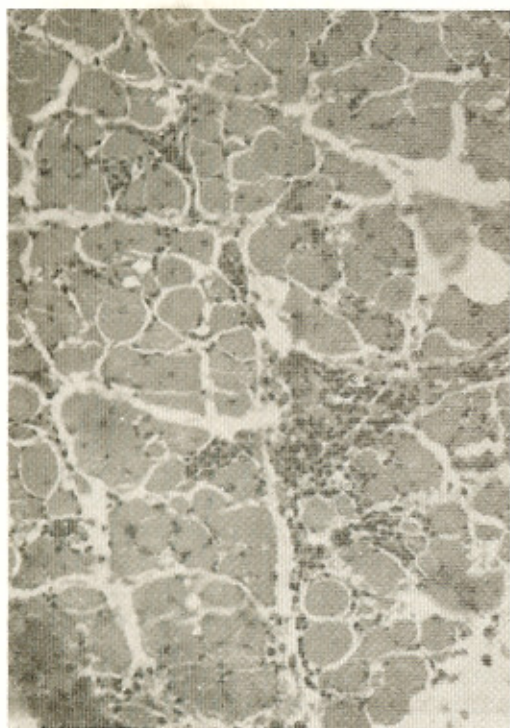


Fig. 4 — Músculo esquelético de animal com infecção crônica pela *cepa Colombiana*, mostrando infiltração mononuclear difusa com adensamento peri-vascular. H. E., 400 X

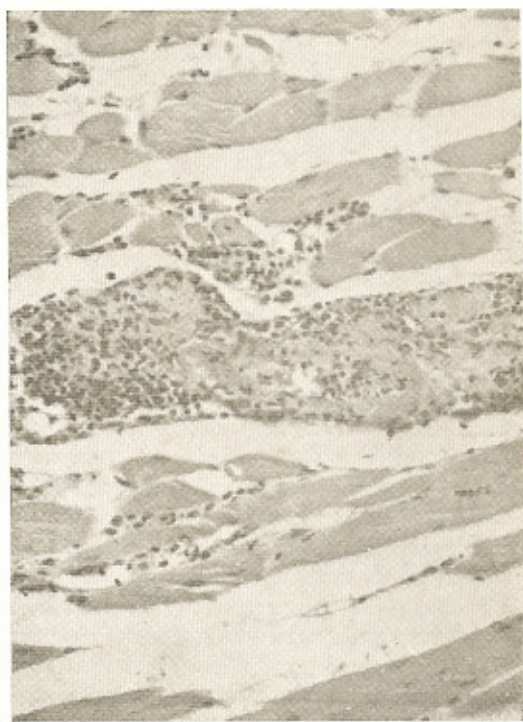


Fig. 5 — *Cepa Colombiana* — Lesão muscular na infecção crônica, observando-se necrose de fibra muscular e infiltrado inflamatório mononuclear. H. E., 400 X

mente destruídos, mas permanecem nos mesmos, constituindo-se numa subinfecção, tem algumas conseqüências que merecem ser analisadas. Em primeiro lugar, isto demonstra que um hospedeiro pode vir a ser portador de mais de uma cepa de *T. cruzi*. Por outro lado demonstra que a imunidade adquirida com uma infecção prévia, é apenas parcial. Teoricamente, pelo menos, a maneira mais eficaz de se estimular a resistência ao tripanosoma, seria por intermédio de uma infecção crônica, com tripanosomas de baixa virulência persistindo no hospedeiro e constantemente reativando os mecanismos imunitários. Todavia, pelo que observamos no presente trabalho, mesmo na situação excepcional delineada acima, o sistema imunitário do hospedeiro pode não ser suficiente para erradicar novos tripanosomas que venham a penetrar no organismo. Quer nos parecer que êstes dados deveriam ser cuidadosamente ponderados quando tivermos que considerar qualquer forma de terapêutica preventiva ou curativa da doença de Chagas através de vacinas.

#### SUMMARY

*Recuperation and characterization of trypanosomes inoculated in immunized mice (Reinoculation with different strains of Trypanosoma cruzi)*

Mice with chronic infection by the *Colombian* strain of *T. cruzi* were inoculated with a virulent strain (*Y strain*). There was no modification in parasitemia nor any change in the histopathological picture, denoting a high degree of resistance in the animals with chronic infection. In order to investigate whether the virulent trypanosomes inoculated were all destroyed in the immunized mice, blood taken from these animals was inoculated in suckling mice and serial transfers were done thereafter. The *Y strain* of *T. cruzi* was then identified by a combination of techniques. The present investigation demonstrates that immunity produced by chronic trypanosome infection is yet partial and that an infection by a particular strain may coexist with an infection by another strain.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. — Estudo histopatológico comparativo de lesões produzidas por duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Hospital (Rio)* 70:101-112, 1966.
2. ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M. & ANDRADE, Z. A. — Influência de infecções repetidas no quadro histopatológico da doença de Chagas experimental. *Gaz. Med. Bahia* 68:115-123, 1968.
3. ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L. & FIGUEIRA, R. M. — Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz. Med. Bahia* Vol. 70(1). No prélo.
4. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:220-224, 1963.
5. BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 59:19-26, 1965.
6. BRENER, Z. — Alguns aspectos da imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:233-238, 1967.
7. DIAS, E. — Estudos sôbre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 28:11-110, 1934.
8. FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. B. & NEVA, F. A. — Chronic and progressive myocarditis and myositis in C<sub>3</sub>H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 13:272-280, 1964.
9. FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, O. & OKUMURA, M. — Histopathology of the heart and muscles in mice immunized against *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:151-156, 1966.
10. HAUSCHKA, T. S.; GOODWIN, J. P. & BROWN, E. — Immunological relationship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. *Amer. J. Trop. Med.* 30:1-6, 1950.
11. KAGAN, G. I. & NORMAN, L. — Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. IV — Serial transfer of organisms from immune to non immune mice. *J. Parasitol.* 48:584-588, 1962.
12. 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.



---

ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L.; FIGUEIRA, R. M. & ANDRADE, Z. A. — Recuperação e caracterização de tripanosomas inoculados em animais imunes. (Reinoculação com diferentes cepas do *T. cruzi*). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:395-402, 1970.

---

13. MENEZES, H. — Imunidade cruzada de camundongos com cepa avirulenta de *T. cruzi* contra outras cepas virulentas do mesmo parasito. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:335-342, 1969.
14. MENEZES, H. — Imunização ativa de cães com uma cepa não virulenta do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11: 258-263, 1969.
15. NUSSENZWEIG, V.; KLOETZEL, J. & DEANE, L. M. — Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Path.* 14:233-239, 1963.
16. PIZZI, T. & PRAGER, R. — Inmunidad a la sobreinfección inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Bol. Inform. Parasitol. (Chilenas)* 7: 20-21, 1952.
17. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Cln. Biol.* 20:191-208, 1953.
18. SILVA, L. H. P. — Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 1:99-118, 1959.
19. TALIAFERRO, W. & PIZZI, T. — Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 96:199-226, 1955.

Recebido para publicação em 15/6/1970.