

EFEITO DA EXCITAÇÃO DO SISTEMA RETÍCULO-ENDOTELIAL PELO ADJUVANTE DE FREUND, NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Sonia G. ANDRADE e Maria Luiza CARVALHO

RESUMO

Em camundongos submetidos a tratamento por adjuvante de Freund completo e por adjuvante de Freund acrescido do liofilizado de tripanosomas, observou-se maior resistência à infecção pelo *T. cruzi* em comparação com um grupo de animais controles não tratados e infetados com inóculo idêntico. O estudo histopatológico mostrou nos animais tratados o desenvolvimento de um processo inflamatório crônico em músculo esquelético e miocárdio o qual era por vêzes mais intenso que nos animais com infecção simples. Este achado sugere que houve excitação de um processo de hipersensibilidade de tipo retardado pelo emprêgo de adjuvante de Freund e demonstra a importância deste mecanismo no desenvolvimento das lesões da fase crônica da doença de Chagas em que há escassos parasitas nos tecidos. A resistência desenvolvida pelos animais foi maior nos tratados pela mistura de adjuvante de Freund e liofilizado de tripanosomas o que poderá ser explicado por uma excitação específica à produção de anticorpos.

INTRODUÇÃO

O estudo de animais experimentalmente infetados por cepas reticulotrópicas do *T. cruzi* mostra o envolvimento intenso e precoce do sistema retículo-endotelial, cujas células mostram-se densamente parasitadas ao nível do baço, fígado, gânglios linfáticos, bem como células endoteliais e células localizadas no tecido conjuntivo frouxo em vários setores do organismo. Além deste parasitismo predominante das células do SRE, há uma difusa hiperplasia reticular que se traduz por aumento acentuado do peso do baço em relação ao peso corporal, hiperplasia da pólpa esplênica, infiltração mononuclear do parênquima hepático, evidências de um estado de hiperreatividade do S.R.E.⁵

Procurando estudar a influência do estado reacional do SRE sobre a infecção chagásica experimental, tivemos a oportunidade de verificar em trabalho anterior² que a excita-

ção deste sistema por uma proteína estranha (gamaglobulina humana) condicionava maior resistência de camundongos à infecção chagásica enquanto o bloqueio pela tinta da China condicionava uma maior suscetibilidade dos animais. Também houve acentuada diminuição de resistência à infecção chagásica em animais tratados com cortisona¹ que atua inibindo o SRE. Um dos meios que têm sido utilizados por diversos pesquisadores para a obtenção de uma excitação acentuada do SRE é a aplicação do adjuvante de Freund^{8, 9, 10, 14, 23}. Em animais tratados pelo adjuvante tem sido observado poderoso estímulo ao SRE, com formação de lesões granulomatosas em várias localizações, hiperplasia de células de Kupffer, hiperplasia da pólpa vermelha do baço, além do desenvolvimento de amiloidose¹⁴.

No presente trabalho procuramos verificar o efeito da excitação prévia do SRE por meio da adjuvante de Freund completo (excitação inespecífica) e também do adjuvante de Freund completo acrescido de liofilizado de *T. cruzi*. Neste último caso além da estimulação inespecífica haveria também uma estimulação específica, que permitiria testar o papel desta estimulação face a uma posterior inoculação com tripanosomas virulentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos brancos pesando entre 12 e 15 g em número de 126, os quais foram divididos em três grupos experimentais, o primeiro constituído por 46 animais submetidos a injeções intramusculares de adjuvante de Freund completo, o segundo grupo com 46 animais que tomaram injeções intramusculares de adjuvante de Freund completo tendo em suspensão liofilizado de cultura de *Trypanosoma cruzi*, após homogeneização e o terceiro grupo, de 34 animais não submetidos a nenhum tratamento. Uma parte dos animais de cada um destes grupos foi submetida a infecção pelo *T. cruzi*

(cepa Y), permanecendo os restantes como contrôles não infetados, como mostra o Quadro I.

Tratamento — Tanto as injeções de adjuvante de Freund puro (*) como de adjuvante de Freund + liofilizado de tripanosomas (**) foram feitas na dose de 0,2 ml por via intramuscular, com 7 dias de intervalo entre cada dose. Em cada grupo tratado, alguns animais tomaram duas doses enquanto os demais tomaram três doses (Quadro I).

Inóculos — Os inóculos foram obtidos de animais infetados pela cepa Y do *T. cruzi*, após passagens sucessivas. O número de tripanosomas variou, sendo que os animais que tomaram três doses do tratamento foram inoculados com 70.000 tripanosomas, enquanto aqueles que tomaram duas doses do tratamento, foram inoculados com 180.000 tripanosomas. As inoculações foram feitas por via intraperitoneal, 8 dias após a última injeção.

Curvas parasitemicas — A parasitemia dos animais infetados foi avaliada diariamente em sangue da cauda, entre lâmina e lamínula, em 50 campos microscópicos de X 400.

QUADRO I

Grupos experimentais estudados

Grupos	N.º de * doses	N.º de animais		
		Infetados	Não infetados	Total
Tratados com adjuvante de Freund ..	2	15	5	46
	3	20	6	
Adjuvante de Freund e liofilizado <i>T. cruzi</i>	2	15	5	46
	3	20	6	
Contrôles não tratados	—	27	7	34

* 0,2 ml por via intramuscular

Inóculos: 180.000 tripanosomas para os que tomaram 2 doses de adjuvante e 70.000 tripanosomas para os que tomaram 3 doses de adjuvante
14 contrôles
13 contrôles

(*) Lanolina + óleo mineral + *Mycobacterium butircum*

(**) Liofilizado de cultura de *T. cruzi* (cepa Y) empregado na proporção de 0,1 mg em cada dose de 0,2 ml de adjuvante de Freund

A mortalidade foi avaliada em porcentagem em relação ao total de animais de cada grupo, excluídos os sacrificados para estudo histopatológico.

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Os animais contrôles não infetados de cada um dos grupos foram sacrificados a partir de 8 dias após o término do tratamento. Os animais infetados foram sacrificados 7, 12, 14, 20 e 27 dias após a inoculação, em número de três para cada grupo, sempre acompanhados de contrôles não infetados. Os animais sacrificados eram pesados e também o baço de cada um e feita, em seguida, a correlação percentual entre o peso corporal e o peso do baço. Os diversos órgãos eram fixa-

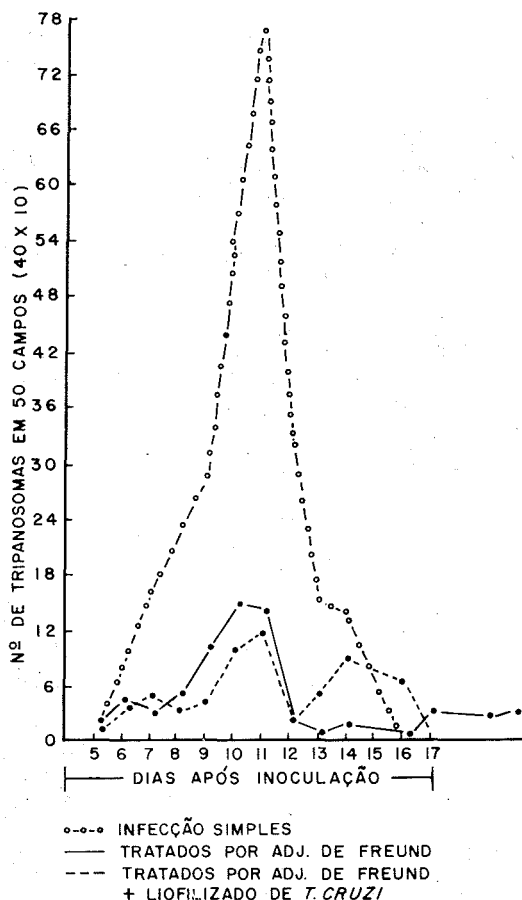


Fig. 1 — Curvas de parasitemia nos animais infetados pelo *T. cruzi*

dos em formol a 10% e os cortes em parafina submetidos a coloração pela hematoxilina e eosina.

RESULTADOS

O estudo das curvas de parasitemia (Fig. 1) mostra que os níveis parasitêmicos se conservam baixos nos grupos tratados com adjuvante de Freund e com adjuvante de Freund + liofilizado de tripanosomas, em relação ao grupo com infecção simples pelo *T. cruzi*.

Os índices de mortalidade também diferiram nos três grupos e estão expressos na (Fig. 2).

Quanto à avaliação da relação percentual entre o peso do baço o peso corporal mostrou que esta porcentagem é maior nos animais infetados, tratados ou não (em média 1,25%) do que nos animais tratados porém não infetados (em média 0,37%) e do que nos contrôles intatos (0,38%).

Estudo histopatológico — A) Estudo dos animais tratados pelo adjuvante de Freund

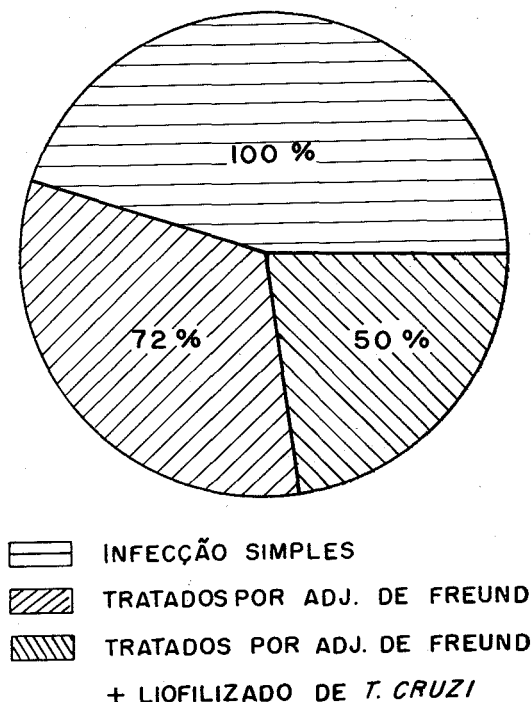


Fig. 2 — Mortalidade nos animais infetados pelo *T. cruzi* até 30 dias

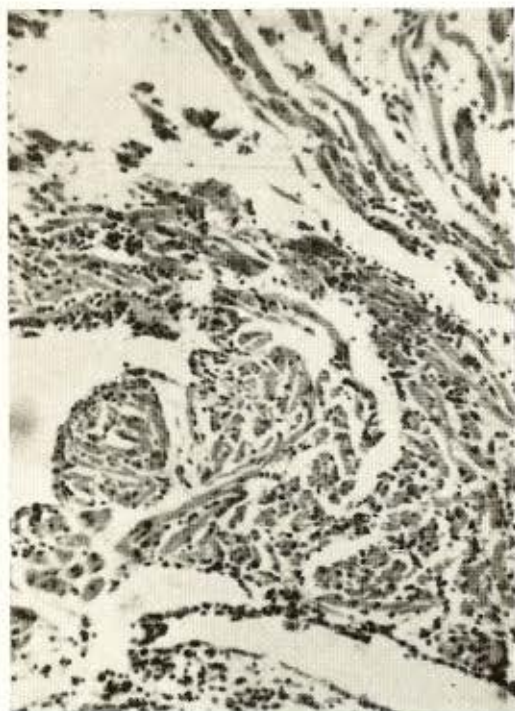


Fig. 3 — Infiltrado inflamatório mononuclear do coração, na ausência de leishmânias, em animal com infecção simples, de 20 dias de duração pelo *T. cruzi*. H.E., 120 X

e pelo adjuvante de Freund + liofilizado de tripanosomas, porém não infetados pelo *T. cruzi* — observou-se em todos a presença de lesão granulomatosa no sítio em que foram feitas as injeções. Havia uma proliferação de células histiocitárias de citoplasma espumoso, vacúolos de gordura (imagens negativas) e denso infiltrado linfo-plasmocitário. Além desta alteração os animais deste grupo mostraram alterações celulares do baço que se evidenciaram por densa infiltração basófila da pólpa vermelha, com acentuada plasmocitose. Nos animais submetidos a três doses do tratamento, principalmente naqueles em que o adjuvante de Freund era acrescido de liofilizado de tripanosomas, desenvolveu-se amiloidose acentuada do baço. No fígado foram vistos focos de infiltração mononuclear do parênquima e infiltração linfocitária dos espaços porta. Os demais órgãos não mostraram alterações histopatológicas; B) Animais com infecção simples — após 7 dias da inoculação, havia apenas discreto parasitismo de cé-

lulas SRE, não se observando reação inflamatória. Nos animais examinados com 12 e 14 dias havia acentuado parasitismo de células do SRE, bem como de músculo cardíaco e de músculo esquelético. O parasitismo se acompanhava de densa infiltração linfo-histiocitária. O baço mostrava hiperplasia reticular e infiltração basófila da pólpa vermelha. O parasitismo nos diversos setores decresceu com o passar dos dias, persistindo apenas em coração e músculo, sempre acompanhado de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário; C) Animais tratados por adjuvante de Freund completo e infetados pelo *T. cruzi* — neste grupo se observou menor parasitismo de SRE, coração e músculo esquelético, porém o processo inflamatório foi da mesma intensidade do observado no grupo com infecção simples, com nítida predominância de células linfocitárias no infiltrado. No baço predominavam infiltração basófila e plasmocitose, ocorrendo

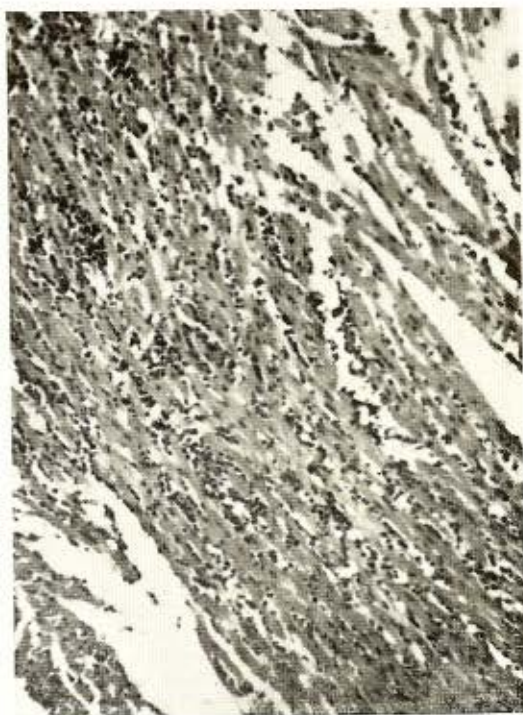


Fig. 4 — Intenso infiltrado inflamatório no coração de animal tratado pelo Adjuvante de Freund, 20 dias após infecção pelo *T. cruzi*. Notar a intensidade da inflamação, apesar da maior resistência à infecção dos animais deste grupo. H.E., 120 X

amiloidose naqueles animais que tomaram três doses do tratamento e D) Animais tratados pelo adjuvante de Freund + liofilizado de tripanosomas e infetados pelo *T. cruzi*. Neste grupo o decréscimo do parasitismo tissular foi ainda mais evidente que no grupo anterior, observando-se, entretanto, processo inflamatório intenso em coração e músculo esquelético. Neste grupo a amiloidose do baço foi mais freqüente e mais intensa que a observada nos animais tratados apenas pelo adjuvante de Freund.

DISCUSSÃO

A observação de que o bloqueio do sistema retículo — endotelial por tinta da China², por tório coloidal¹¹, ou a sua depleção por meio de cortisona^{1, 12, 20, 22, 24}, influem de maneira decisiva no curso da infecção experimental pelo *T. cruzi*, determinando infecções mais graves, indica que o SRE funciona como linha de defesa do organismo à invasão parasitária. Inversamente a excitação deste sistema por uma proteína estranha² condiciona maior resistência do animal à infecção chagásica.

No presente trabalho constatou-se que a estimulação do SRE pelo adjuvante de Freund (inespecífica) ou pelo adjuvante de Freund adicionado com liofilizado de tripanosomas (específica), é capaz de conferir aos animais certo grau de resistência à infecção chagásica, com curvas parasitêmicas mais baixas e menores índices de mortalidade nos animais tratados, os quais mostravam também menor grau de parasitismo tissular. Atuando o adjuvante de Freund como poderoso estimulante do SRE, pode-se deduzir que a estimulação mesmo inespecífica deste sistema, conferiu maior capacidade de resistência do animal à infecção chagásica. Outro fato que nos pareceu de interesse foi a observação de que, apesar da resistência desenvolvida pelos animais tratados, à infecção chagásica, o processo inflamatório foi nestes animais muito intenso, por vêzes maior do que naqueles não submetidos a prévia estimulação pelo adjuvante. Sabe-se que o adjuvante de Freund, além de potencializar a formação de anticorpos face a numerosos agentes antigênicos^{8, 9, 10}, excita as reações de hipersensibilidade

de tipo retardado^{7, 13, 15, 18, 23}. Por outro lado, na infecção chagásica ocorrem lesões tissulares atribuídas por muitos Autores a um mecanismo de hipersensibilidade, tais como alterações vasculares de arterite necrotizante^{4, 6, 17, 21}, lesões inflamatórias miocárdicas que ocorrem na fase crônica, não explicáveis pelos escassos parasitas existentes nos tecidos^{5, 16}, além das lesões de miocardite obtidas experimentalmente por MUNIZ & AZEVEDO¹⁹ com injeções repetidas de tripanosomas mortos.

A ocorrência em nosso material de intenso processo inflamatório crônico, com predominância linfocitária, em animais que desenvolveram maior resistência à infecção chagásica, pode ser interpretado como um indício de que nestes animais se desenvolveu um mecanismo de hipersensibilidade de tipo retardado, excitado pelos injeções do adjuvante de Freund.

Pôde-se, pois, observar nesta experiência dois fatos que nos parecem importantes: 1) o desenvolvimento de resistência nos animais tratados, provavelmente condicionada pela excitação específica à produção de anticorpos; 2) o desenvolvimento de alterações inflamatórias mais intensas em animais com evidências de maior resistência, que sugere a atuação de um processo de hipersensibilidade de tipo retardado, excitado no caso, pelas injeções de adjuvante de Freund.

Sabe-se que a doença de Chagas é mais grave em crianças de pouca idade, ocorrendo sob a forma de uma infecção generalizada (forma aguda). Em vista dos fatos aqui observados podemos admitir que esta maior suscetibilidade pode decorrer, pelo menos em parte, da relativa imaturidade do sistema retículo-endotelial. Por outro lado, a resistência ao parasita, como vemos freqüentemente em adultos infetados, pode coexistir com uma maior reação inflamatória, face aos escassos parasitas existentes.

SUMMARY

Effect of excitation of the reticulo-endothelial system by Freund's adjuvant, in experimental Chagas' disease

Mice previously treated by complete Freund's adjuvant and by Freund's adjuvant

plus dried trypanosomes showed more resistance to a *T. cruzi* infection than the controls with the infection alone. However, inflammatory changes were even more marked in the treated animals. This was interpreted as resulting from a delayed hypersensitive reaction to *T. cruzi* enhanced by the Freund's adjuvant. Resistance to infection was greater in the group that received Freund's adjuvant together with dead trypanosomes. The production of specific antibodies in this group should be accounted for this result.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. — Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Hospital* (Rio) 70:1267-1278, 1966.
2. ANDRADE, S. G.; SILVA, A. A. & ANDRADE, Z. A. — Bloqueio e estimulação do SRE na doença de Chagas (estudo experimental em camundongos). *Gaz. Méd. Bahia* 67:19-30, 1967.
3. ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. — Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:180-187, 1968.
4. ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G. — Patologia da Doença de Chagas (Forma crônica cardíaca). *Bol. Fundação Gonçalo Moniz* 6:1-53, 1955.
5. ANDRADE, Z. A. & LOPES, E. A. — A histochemical study of experimental Chagas disease. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:236-242, 1963.
6. BRITO, T. de & VASCONCELOS, E. — Necrotizing arteritis in megaesophagus. (Histopathology of ninety one biopsies taken from the cardia). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 2:17-28, 1960.
7. BRITO, T. de — *Miocardite alérgica do coboio e sua possível relação com a cardite chagásica experimental*. Tese. Fac. Med. Univ. São Paulo, 1962.
8. FREUND, J. & ANNABEL, W. A. — Saprophytic acid fast bacilli and paraffin oil as adjuvants in immunization. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 56:47-50, 1944.
9. FREUND, J.; THOMSON, J.; HOUGH, H. B.; SOMMER, H. E. & PISANI, T. M. — Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants. *J. Immun.* 60:383, 1948.
10. FREUND, J. & BONANTO, M. — The effect of paraffin oil, lanolin-like substances and killed tubercle bacilli in immunization with diphtheric toxoid and bact. typhosum. *J. Immun.* 48:325, 1949.
11. GOBLE, F. C. & SINGER, I. — The reticuloendothelial system in experimental malaria and trypanosomiasis. *An. New York Acad. Sci.* 88:149-171, 1960.
12. JARPA, A.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R. A. & ATIAS, V. — Ensayos de quimioterapia de la enfermedad de Chagas experimental. VII — Cortisona y fosfato de Pentaquina. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 6:25-27, 1951.
13. KABAT, E. A.; WOLF, A. & BEZER, A. E. — The rapid production of acute disseminate encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J. Exp. Med.* 85:117-129, 1947.
14. LAUFFER, A.; TAL, C. & BEHAR, A. J. — Effect of adjuvant (Freund's type) and its components on the organs of various animals species: A comparative study. *Brit. J. Exp. Path.* 40:1-7, 1959.
15. LIPTON, M. M. & FREUND, J. — Allergic encephalomyelitis in the rat induced by the intracutaneous injection of central nervous system tissue and adjuvants. *J. Immun.* 71:98-109, 1953.
16. MAGARINOS TÓRRES, C. B. — Patogenia das lesões do miocárdio na doença de Chagas. *Rev. Gaiana. Med.* 4:121-134, 1958.
17. MAGARINOS TÓRRES, C. B. & TAVARES, B. M. — Miocardite no macaco *cebus* após inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 56:85-119, 1958.
18. MORGAN, I. — Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey nervous tissue. *J. Exp. Med.* 85:131-143, 1947.
19. MUNIZ, J. & AZEVEDO, P. A. — Novo conceito da patogênica da doença de Chagas (Trypanosomiasis americana). *Hospital* (Rio) 32:165, 1947.
20. NEHME, A.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R. A.; JARPA, A. & ATIAS, V. — Ensayos de quimioterapia de la enfermedad de Chagas experimental. VIII — Acción de la cortisona sola y asociada al fosfato de pentaquina y al compuesto de sulfato de quinina fosfato de pentaquina. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 6:36-37, 1951.

ANDRADE, S. G. & CARVALHO, M. L. — Efeito da excitação do sistema reticulo-endotelial pelo adjuvante de Freund, na doença de Chagas experimental. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:229-235, 1969.

21. OKUMURA, M.; BRITO, T. de; SILVA, L. H. P. da; SILVA, A. C. & CORRÊA Netto, A. — The pathology of experimental Chagas' disease in mice. I — Digestive tract changes with a reference to necrotizing arteritis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 2:17-28, 1960.
22. PIZZI, T. & CHEMKE, J. S. — Acción de la cortisona sobre la infección experimental de la rata por *Trypanosoma cruzi*. *Biologica* 21:31-58, 1955.
23. RAFFEL, S. & FORNEY, J. E. — The role of the wax of the tubercle bacillus in establishing delayed hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 88:485-502, 1948.
24. THIERMANN, E. & CHRISTEN, R. A. — Influencia del acetato de cortisona y de la aureomicina como agente agravador de la infección chagásica atenuada. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 7:53-55, 1952.

Recebido para publicação em 5/3/1969.