

## ESTUDO DA PATOGENICIDADE DA *LEPTOMONAS PESSOAI* EM CAMUNDONGOS, APÓS ADMINISTRAÇÃO DE ALTAS DOSES DE CORTICÓIDE

Ricardo RIBEIRO DOS SANTOS (1), Humberto MENEZES (2)  
e Vicente AMATO NETO (3)

### RESUMO

Tendo em vista a perspectiva de uso da *Leptomonas pessoai* na imunização ativa referente à doença de Chagas, os Autores realizaram estudo acerca da patogenicidade desse protozoário em camundongos submetidos à imunossupressão por meio de elevadas doses de corticóide. Demonstraram que a inoculação de grandes quantidades de formas vivas mostrou-se incapaz de infectar os animais. Os fatos apurados foram interpretados como bastante auspiciosos, em virtude da possibilidade de emprego desse flagelado para proteção contra infecção virulenta causada pelo *Trypanosoma cruzi*.

### INTRODUÇÃO

A *Leptomonas pessoai* é um flagelado tripanossomatídeo isolado do *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) por GALVÃO & col.<sup>4</sup>. Posteriormente, teve sua colocação sistemática posta em dúvida e foi aventada a hipótese de pertencer ao gênero *Herpetomonas* (BARBOSA & col.<sup>2</sup>). BARBOSA & col.<sup>1, 2</sup> e RIBEIRO DOS SANTOS & col.<sup>11</sup> mostraram que esse protozoário apresenta identidade antigênica com o *Trypanosoma cruzi* e SOUZA & ROITMAN<sup>12</sup> verificaram que a inoculação de formas vivas protege camundongos em relação à infecção tripanossômica produzida por amostra altamente virulenta.

Considerando a importância de tais fatos, resolvemos estudar a patogenicidade da *L. pessoai* em camundongos que receberam altas doses de corticóide.

### MATERIAL E MÉTODOS

A cinqüenta camundongos albinos, machos, com 10 g  $\pm$  1 g de peso, administramos, pela via intraperitoneal, 0,02 mg/g de succinato de hidrocortisona diariamente, durante 20 dias.

Após cinco doses, inoculamos os animais, de maneira idêntica, com 10<sup>9</sup> formas vivas de *L. pessoai*, obtidas de culturas com 48 horas, realizadas em meio de WARREN<sup>13</sup> modificado, pois houve substituição do sangue total por hemina, na concentração de 2 mg%, e adição de 0,2 mg% de ácido fólico; sendo de 7,0 o pH final do meio.

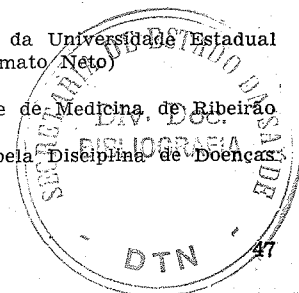
Obtivemos o inóculo depois de três lavagens dos flagelados em solução salina tamponada com fosfatos (pH 7,2); em seguida à última, diluímos o sedimento, de forma a fazer com que 10<sup>9</sup> elementos estivessem contidos no volume de 0,3 ml.

Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas. Disciplina de Doenças Transmissíveis (Prof. Vicente Amato Neto)

(1) Assistente da Disciplina de Doenças Transmissíveis

(2) Professor Adjunto do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo

(3) Professor Titular do Departamento de Clínica Médica, responsável pela Disciplina de Doenças Transmissíveis



A análise da patogenicidade da *L. pessoai* teve lugar através dos processos a seguir especificados:

a) *controle da parasitemia*, segundo a técnica de Pizzi-Brener (BRENER<sup>3</sup>), executado em 20 animais, nos 8.<sup>o</sup>, 15.<sup>o</sup>, 20.<sup>o</sup> e 30.<sup>o</sup> dias posteriores à inoculação;

b) *hemocultura*, efetuada nessas mesmas ocasiões e no que concerne a 5, 5, 5 e 10 camundongos; retiramos o sangue por punção cardíaca e semeamos 0,5 ml no meio mencionado;

c) *histopatologia*, também nas oportunidades indicadas no item anterior e utilizando idênticos números de roedores que, sacrificados nas épocas assinaladas, possibilitaram a retirada de coração, fígado e baço, para fixação em formalina a 10%, impregnação em parafina, execução de cortes e coloração pela hematoxilina-eosina;

d) *pesquisa de antígenos teciduais*, efetivada por técnica da imunofluorescência indireta nos órgãos coletados para avaliação histopatológica;

e) *determinação da taxa de mortalidade*, calculada decorrido um mês e a propósito de 35 animais, permanecendo como parâmetro um lote de 20, nos quais apenas aplicamos quantidades idênticas de corticóide.

Detalhando o método que se valeu de imunofluorescência, informamos que dez fragmentos das vísceras sofreram congelamento em nitrogênio líquido e, posteriormente, cortes em criostato a -20°C e incubação durante uma hora com soro de coelho imunizado com *L. pessoai*; lavamos então com solução salina tamponada com fosfatos (pH 7,4) e, novamente, por período de tempo igual, houve incubação com antigamaglobulina de coelho marcada pelo isotiocianato de fluoresceína ("Hyland"), com relação molar F/P de 6,7; processados outros idênticos empregos de soluto fisiológico, puderam ser realizadas montagens em lamínulas com glicerina submetida a tamponamento (pH 8,9). Para os exames recorremos a microscópio "Olympus F.L.M.", com filtros B.V. e Y52 como excitador e barreira.

## RESULTADOS

No que diz respeito a todos os animais, nas diversas fases de controle, não detectamos parasitemia. Igualmente, resultaram sempre negativas as múltiplas hemoculturas e as pesquisas de antígenos de *L. pessoai* nos tecidos, através da imunofluorescência indireta.

As verificações histopatológicas estão adiante especificadas: coração — raros e discretos focos com infiltrado linfo-histiocitário; fígado — moderado infiltrado multifocal, linfo-histiocitário, mais acentuado do que o visível no músculo cardíaco, e hiperplasia retículo-endotelial; baço — evidente hipoplasia da polpa branca. Nos camundongos que morreram durante a experimentação encontramos pneumonia intersticial e, salientamos, nas múltiplas preparações examinadas, relativas a diferentes órgãos, não notamos a existência de formas amastigotas teciduais.

A mortalidade, calculada 30 dias depois da inoculação da *L. pessoai*, foi de 11,4% quando também injetamos corticóide, e apuramos taxa de 15% a propósito de componentes do grupo que só receberam o hormônio. Interpretamos a diferença como inexpressiva e as cifras em questão disseram respeito a 35 e 20 animais respectivamente.

## DISCUSSÃO

A inoculação de elevado número de formas vivas da *L. pessoai*, em camundongos submetidos à imunossupressão com corticóide, não produziu alterações significantes.

As anomalias histopatológicas encontradas foram muito semelhantes às descritas ao serem inoculados animais com a amostra PF do *T. cruzi*, considerada como avirulenta e dotada de ação imunizante com referência à infecção motivada por tal tipo de protozoário (MENEZES<sup>5, 6, 7, 8, 9, 10</sup>).

Verificamos que a *L. pessoai*, nas condições segundo as quais realizamos nossas observações, mostrou-se incapaz de infectar os roedores utilizados.

Os fatos apurados são, acreditamos, bastante auspiciosos, em virtude de perspectiva de emprego desse flagelado para proteção contra infecção virulenta causada pelo *T. cruzi*.

A conveniência e a validade de obtenção de conduta apta a propiciar imunização ativa referente à doença de Chagas estão atualmente bastante em foco. Traduzem, por outro lado, desideratos perseguidos intensamente nos últimos anos, através da coleta de dados realmente valiosos; além disso, encerram significado marcante em termos práticos, diante do problema que essa protozoose representa em países americanos. Esse panorama concede expressividade às tentativas recentes de imunização por meio da *L. pessoai*, no âmbito das quais os resultados que agora comunicamos podem conter alguma utilidade.

#### S U M M A R Y

#### *Study on Leptomonas pessoai pathogenicity in mice submitted to high doses of corticosteroid*

Taking into account the possibility of *Leptomonas pessoai* developing an active immunization against Chagas' disease, the investigators carried out a study on the pathogenicity of such a protozoan in mice in which immunodepression has been produced by means of high doses of corticosteroid. The Authors have shown that the inoculation of large amounts of alive protozoa in mice did not determine any infection in these animals whatsoever. The observed facts seem to be highly auspicious since the employment of the above flagellate has been advised as a protective weapon against the infection caused by *Trypanosoma cruzi*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, W.; ALMEIDA, M. & ALVES, D. P. — Imunologia da leishmaniose tegumentar americana. II — Imunofluorescência indireta com antígenos de *Leptomonas pessoai*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi*. Apresentado no IX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado em Fortaleza, de 4 a 7 de fevereiro de 1973.
2. BARBOSA, W.; SOUZA, M. C. M.; RASSI, D. M.; OLIVEIRA, R. L. & MOTA, L. — Investigação sobre imunologia da leishmaniose tegumentar americana. I — Intradermo reação de Montenegro concomitante com antígenos de *Leptomonas pessoai* e "*L. brasiliensis*". *Rev. Pat. Trop.* 1:377-383, 1972.
3. BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese. Fac. Farm. Odont. Univ. Minas Gerais, 1961.
4. GALVAO, A. B.; OLIVEIRA, R. L.; CARVALHO, A. L. M. & VEIGA, G. P. — *Leptomonas pessoai* sp.n. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida, Protozoa). *Rev. Goiana Med.* 16:229-236, 1970.
5. 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.
6. MENEZES, H. — Lesões histológicas em camundongos "vacinados" com uma cepa avirulenta de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Brasil. Med.* 25:160-165, 1968.
7. MENEZES, H. — I — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:64-68, 1970.
8. MENEZES, H. — II — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:129-135, 1970.
9. MENEZES, H. — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. IV — The effect of immunosuppressive agents in mice. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 5:213-233, 1971.
10. MENEZES, H. — The avirulence of the cultivated PF strain of *Trypanosoma cruzi*. VI — Induced immunotolerance in mice by a very high inoculum. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 6:79-84, 1972.
11. RIBEIRO DOS SANTOS, R.; MENEZES, H. & AMATO NETO, V. — Diagnóstico sorológico da doença de Chagas usando antígeno de *Leptomonas pessoai*. Apresentado no IX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado em Fortaleza, de 4 a 7 de fevereiro de 1973.
12. 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.
13. WARREN, L. G. — Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I — Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *J. Parasit.* 46:529-539, 1960.

Recebido para publicação em 2/4/1973.