

EFEITOS DE RAIOS GAMA SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Ednir SALATA⁽¹⁾, Frederico M. WIENDL⁽²⁾ e Fernando M. A. CORRÊA⁽³⁾

RESUMO

São verificados os efeitos de diferentes doses de radiação gama sobre a morfologia, motilidade, reprodutibilidade, virulência e capacidade protetora de formas de cultura de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, mantidas em meio de Warren ou inoculadas em camundongos. Mesmo com dose máxima de 90 krad, não foram detectadas alterações de morfologia e de motilidade sendo que a reprodutibilidade foi parcialmente abolida até com doses inferiores à máxima empregada. Formas de cultura tiveram sua virulência diminuída quando submetidas a dose de 60 krad e totalmente abolida quando a dose foi de 90 krad. Tripanossomos irradiados com 90 krad e inoculados em camundongos não conferiram proteção quando, posteriormente, tais camundongos foram submetidos a inoculação com formas sanguíneas virulentas não irradiadas.

INTRODUÇÃO

A partir do trabalho inicial de BRUMPT², inúmeros Autores têm confirmado a presença de sólida imunidade a superinfecções de animais que ultrapassaram a fase aguda e alcançaram a fase crônica da Doença de Chagas.

DIAS⁶ confirmou os trabalhos de BRUMPT sobre a presença de imunidade em animais que sobreviveram à fase aguda e, também, os trabalhos de MAYER & ROCHA LIMA¹⁴, sobre a ausência de imunidade passiva pela transferência de soros de animais ativamente imunizados.

O emprego de flagelados mortos por processos físicos ou químicos utilizado por JOHNSON & col.¹², GONZÁLEZ-CAPPA & col.⁹ e outros²⁰, tem apresentado resultados alentadores na imunização de camundongos, na dependência do método utilizado para matar os hemoflagelados, da frequência de inoculação, da amostra usada para a imunização e do uso de adjuvantes. Entretanto, tais ca-

mundongos imunizados apresentam parasitemia, embora transitória e baixa, após a infecção com formas virulentas.

Segundo COLLIER⁵, a imunidade de camundongos contra o *Trypanosoma cruzi* depende da contínua presença desse flagelado no tecido somático.

Os experimentos de PIZZI & PRAGER²¹ demonstraram uma marcada imunidade em camundongos inoculados com formas de cultura de virulência atenuada do flagelado, as quais causavam infecções embora clinicamente inaparentes. Algumas dessas observações foram recentemente confirmadas por MENEZES & ALBUQUERQUE¹⁸, utilizando um "mutante" da cepa Y, para o qual estes Autores sugerem a designação de cepa PF.

A inoculação de formas virulentas, em camundongos imunizados através da inoculação de formas vivas de tripanossomo de virulência atenuada, produz infecções. Tais in-

Trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu e no Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" da Universidade de São Paulo

- (1) Professor Assistente de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, São Paulo, Brasil
- (2) Professor Livre Docente do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil
- (3) Professor Titular de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, São Paulo, Brasil

fecções são demonstráveis por métodos laboratoriais^{15, 18, 21}.

Outros pesquisadores têm procurado verificar a ação de agentes capazes de inibir a infetividade sem, entretanto, matar os flagelados parasitas. Estudos referentes a efeitos de radiações sobre diferentes organismos celulares têm sido realizados desde a descoberta do raio X. Assim HALBERSTAEDTER¹⁰ verificou que o *Trypanosoma brucei* perdia sua infetividade, porém mantinha sua motilidade, quando tratado com radium. BRUYNOCHE³ confirmou os achados de HALBERSTAEDTER. PATEL¹⁹ demonstrou que culturas de *T. brucei* eram resistentes à ação dos raios X, porém rapidamente destruídas quando expostas à radiação ultra-violeta.

Expondo *Trypanosoma gambiense* a uma fonte de raio X, HALBERSTAEDTER¹¹ verificou perda de infetividade para camundongos, com doses de 12.000 r, enquanto que 600.000 r destruíam os flagelados.

Outros pesquisadores, tais como EMMETT⁸, CHIARI & col.⁴, DUXBURY & SADUN⁷ e MARTINEZ-SILVA & col.¹³, trabalhando com diferentes espécies e cepas do hemoflagelado e com diferentes fontes de radiação, encontraram sempre alterações biológicas nesse protozoário.

Segundo MARTINEZ-SILVA & col.¹³, diferentes cepas de tripanossomo, apresentam habilidade reprodutiva variável, o mesmo ocorrendo com a radiossensibilidade dessas cepas.

Procuramos verificar, no presente trabalho, os efeitos de diferentes doses de radiação gama sobre formas de cultura da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, mantidas em meio de cultura ou inoculadas em camundongos. Procuramos verificar possíveis alterações na motilidade, reprodutibilidade, morfologia, virulência e capacidade protetora do protozoário exposto àquela radiação.

MATERIAL E METODOS

Irradiação dos Parasitas

Formas de cultura em meio de WARREN²⁴ de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, foram submetidas a diferentes doses de radiação fornecida por uma fonte gama de Co-60, apresentando atividade de 640 curies e uma taxa

de irradiação de, aproximadamente, 66,5 krad/hora, a 10 cm.

Motilidade, Morfologia e Reprodução

Imediatamente após a exposição e após a incubação em estufa a 28°C durante 7 dias, as culturas eram examinadas a fresco, com aumento de 600 X, para verificar possíveis alterações na motilidade, morfologia e na capacidade de reprodução dos tripanossomos. A capacidade reprodutiva foi estimada através da técnica de PIZZI, modificada por BRENER¹, calculando-se, em 3 amostras do meio, o número médio de tripanossomos por ml de meio de cultura.

Virulência

Observações quanto a alterações do período pré-patente, de percentagem de infetividade e de mortalidade, observada durante 90 dias após a inoculação inicial, foram realizadas no sentido de se verificar variações de virulência. Para isso, camundongos albinos de 23 dias, pesando de 15 a 17 g, foram inoculados com doses de 100.000 formas de cultura de tripanossomo submetidas a diferentes doses de raios gama.

O inóculo, lavado várias vezes através sucessivas centrifugações em solução salina, até que o sobrenadante se tornasse límpido, foi introduzido por via intraperitoneal.

Verificação da Infecção

A infecção foi seguida através de exames de sangue a fresco, xenodiagnóstico, hemocultura e subinoculação. Os exames de sangue a fresco foram realizados a cada 24 ou 48 horas, durante um tempo máximo de 35 dias após a inoculação inicial. Os xenodiagnósticos foram realizados utilizando-se duas ninfas de 5.º estágio de *Triatoma infestans*, para cada camundongo com exames de sangue sucessivamente negativos até o 35.º dia. As hemoculturas foram realizadas em meio de Warren e mantidas em estufa a 28°C, durante 7 dias, após o que foram examinadas e desprezadas.

As subinoculações foram realizadas em camundongos de 23 dias, os quais, após essa inoculação, foram examinados durante 7 dias consecutivos.

Imunização Experimental

Para verificar o efeito imunizante de formas de cultura de *T. cruzi* expostas à radiação gama, camundongos foram inoculados, obedecendo o seguinte esquema:

Lote A: 15 camundongos receberam 2 doses de 100.000 formas de cultura de tripanossomos expostas a 90 krad, sendo de um mês o intervalo entre as doses;

Lote Controle B: 15 camundongos receberam 2 doses de 30.000 formas de cultura de tripanossomos não irradiadas, com um mês de intervalo entre as doses;

Lote B: 15 camundongos receberam 4 doses de 100.000 formas de cultura de tripanossomos irradiadas com 90 krad, sendo de 7 dias o intervalo entre as doses;

Lote Controle B: 15 camundongos receberam 4 doses de 30.000 formas de cultura de tripanossomos não irradiadas, a intervalos de 7 dias;

Lote C: 15 camundongos normais e que não foram inoculados.

Sete dias após a aplicação da última dose imunizante nos Lotes A, B e seus controles, os 5 lotes foram inoculados com formas sanguíneas de *T. cruzi* não irradiadas. A dose utilizada foi de 5.000 tripanossomos por g de peso do camundongo.

RESULTADOS

As doses utilizadas, bem como seus efeitos sobre a capacidade de reprodução da cepa Y de *T. cruzi* em meio de Warren, estimada após 7 dias de incubação, encontram-se na Tabela I.

Nenhuma alteração de motilidade ou na morfologia dos hemoflagelados foi observada até doses máximas de 90 krad.

Entretanto, como se pode notar na Tabela I, já com doses inferiores à máxima por nós

TABELA I

Crescimento, em meio de Warren, de *Trypanosoma cruzi* submetido a diferentes doses de radiação gama

Dose de raios gama em krad	Média do n.º de <i>T. cruzi</i> por ml de meio, antes da irradiação	Média do n.º de <i>T. cruzi</i> por ml de meio, 7 dias após a irradiação
0	3×10^6	$6,5 \times 10^6$
30	3×10^6	$3,1 \times 10^6$
60	3×10^6	$2,7 \times 10^6$
90	3×10^6	$2,6 \times 10^6$

TABELA II

Infetividade de formas de cultura da cepa Y de *T. cruzi* submetidas a diferentes doses de radiação

Dose de raios gama em krad	Exame de sangue a fresco					Xenodiagnóstico	Hemocultura	Subinoculação	% de infecção
	Dias após a inoculação								
	7	14	21	28	35				
30	(*) (**) 0/30	30/30	—	—	—	—	—	—	100,0
60	0/29	8/29	13/29	15/29	15/29	0/14	0/14	0/14	51,7
90	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0
Controle I (***)	30/30	—	—	—	—	—	—	—	100,0
Controle II (****)	21/30	30/30	—	—	—	—	—	—	100,0

(*) Número de camundongos positivos

(**) Número de camundongos inoculados

(***) Camundongos inoculados com formas sanguíneas de *T. cruzi* não irradiadas

(****) Camundongos inoculados com formas de cultura de *T. cruzi* não irradiadas

utilizada, a reprodutibilidade foi alterada.

As inoculações de camundongos mostraram aumento de período pré-patente e diminuição da percentagem de camundongos infetados (Tabela II), e da percentagem de mortalidade dos camundongos, observada durante 90 dias (Tabela III).

A supressão total da virulência dos tripanossomos foi obtida com dose de 90 krad e

repiques semanais, em cultura, de tripanossomos irradiados com essa mesma dose, tornaram-se estéreis após a 4.^a semana.

Os resultados obtidos com inoculação de formas sanguíneas não irradiadas de *T. cruzi*, cepa Y, em camundongos previamente imunizados com formas de cultura de tripanossomos irradiados com 90 krad e controles, estão expressos na Tabela IV e nos mostram que tais

TABELA III

Mortalidade de camundongos inoculados com cepa Y de *T. cruzi* submetida a diferentes doses de radiação

Dose de raios gama em krad	Dias após a inoculação						% de mortalidade
	15	30	45	60	75	90	
30	(*) (**) 0/30	3/30	4/30	4/30	4/30	4/30	13,3
60	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0
90	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0
Controle I (***)	30/30	—	—	—	—	—	100,0
Controle II (****)	0/30	8/30	9/30	9/30	11/30	13/30	43,3

(*) Número de camundongos mortos

(**) Número total de camundongos em observação

(***) Camundongos inoculados com formas sanguíneas de *T. cruzi* não irradiadas

(****) Camundongos inoculados com formas de cultura de *T. cruzi* não irradiadas

TABELA IV

Infetividade e mortalidade de camundongos "imunizados" com formas de cultura de tripanossomos irradiados com 90 krad e controles observados durante 90 dias após a inoculação com formas sanguíneas não irradiadas

Lote	N.º de doses imunizantes	Dias de intervalo entre as doses	Dose imunizante	Período pré-patente máximo (*)	% de infecção	% de mortalidade
A	2	30	100.000	5	100	86,6
Controle A	2	30	30.000	5	100	0
B	4	7	100.000	5	100	66,6
Controle B	4	7	30.000	5	100	66,6
C	0	—	—	5	100	66,6

(*) Consideramos como período pré-patente máximo, o número de dias necessários para ocorrência de 100% de infecção.

formas irradiadas não conferem proteção, independentemente do número de doses imunizantes e do intervalo entre as mesmas.

DISCUSSÃO

De acordo com EMMETT⁸, doses de 10.000 r a 100.000 r de raios X não alteram nem a motilidade nem a morfologia do *T. cruzi* mantido em meio de cultura. Entretanto, doses de 51.000 r a 100.000 r são suficientes para destruir o poder infetante das formas de cultura do hemoflagelado.

Segundo MARTINEZ-SILVA & col.¹³, que trabalharam com 3 cepas diferentes de *T. cruzi*, alterações de motilidade e de morfologia só são observadas com altas doses de radiação. Por outro lado, segundo esses mesmos Autores, a inibição da infetividade depende tanto da dose de radiação como do poder infetante da cepa, via de inoculação e número de organismos inoculados. Assim é que, doses de 50 krad aboliram a capacidade infetante da cepa *Corpus christi*, enquanto doses superiores a 100 krad são necessárias para inibir o poder infetante de cepas mais virulentas, tais como a Bertoldo e a Tulahuen.

Trabalhando com cepa MR, cultivada em meio LIT, CHIARI & col.⁴ observaram correlação entre diferentes doses de raios gama e queda nas curvas de crescimento do *T. cruzi*, bem como diminuição da infetividade das formas de cultura a partir de doses de 60 krad. Para abolir totalmente a capacidade infetante da cepa estudada por esses Autores, foram necessárias doses de 120 krad. Camundongos previamente inoculados com 3 doses semanais de formas de cultura da cepa MR irradiadas com 120 krad e que foram reinoculados com formas sanguíneas e de culturas não irradiadas da mesma cepa, apresentaram resultados positivos, o que demonstra que as formas irradiadas não conferiram imunidade. Os resultados encontrados por CHIARI & col.⁴ estão em pleno acordo com os obtidos por STUBBS & col.²³, que utilizaram em seus experimentos *T. equiperdum* submetido à ação de raios X.

Como o uso de radiações ionizantes em tentativas de imunizações contra infecções por protozoários da família *Trypanosomatidae* tem sido infreqüente, DUXBURY & SADUN⁷, trabalhando com *T. rhodesiense* exposto

à radiação gama, confirmaram os resultados obtidos por SANDERS & WALLACE²² que demonstraram sólida imunidade em ratos inoculados com *T. lewisi* irradiado com raios X.

Nossos experimentos, com técnicas e cepas diferentes das utilizadas por outros pesquisadores^{4, 8, 13}, vêm confirmar grande parte dos resultados por eles obtidos.

De nossas observações podemos concluir que nem a motilidade, nem a morfologia de formas de cultura da cepa Y de *T. cruzi*, mesmo submetidas a doses máximas de 90 krad, mostram-se alteradas, ao exame a fresco, através de microscopia comum.

Mesmo doses inferiores a 90 krad são suficientes para produzir queda na curva de crescimento do protozoário mantido em meio de cultura.

Aumento do período pré-patente, diminuição da porcentagem de camundongos infetados e da mortalidade dos camundongos, expressos nas Tabelas II e III, demonstram diminuição da virulência da cepa Y de *T. cruzi* proporcional às doses de radiação.

A inoculação de formas irradiadas com 90 krad não conferiu imunidade a camundongos reinoculados com formas sanguíneas não irradiadas, o que nos leva a crer na possibilidade de alteração da capacidade antigênica do tripanossomo irradiado.

SUMMARY

Effects of gamma radiation on Trypanosoma cruzi

The Authors study the effects of different dosages of gamma radiation upon the morphology, motility, reproductivity, virulence and protective capacity of culture forms of *Trypanosoma cruzi*, Y strain, kept in Warren medium and inoculated into mice.

Alterations of morphology and motility of the parasites were not detectable even with doses of 90 krad. The reproductivity was partially abolished with dosages of 30 or more krad.

When submitted to dosages of 60 krad, culture forms of Y strain of *T. cruzi* diminished their virulence and when the dosage was 90 krad it was abolished.

Trypanosomes irradiated with 90 krad and inoculated into mice did not afford any pro-

tection when the mice were submitted to a challenge inoculation with non irradiated virulent blood forms.

AGRADECIMENTOS

Os Autores desejam externar seus agradecimentos ao Sr. João Milton Meneghim, pela valiosa assistência técnica prestada durante a realização do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRENER, Z. — *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas*. 79 págs., mimeografadas. Belo Horizonte, 1961.
2. BRUMPT, E., 1913 — *In* DIAS, E., 1934.
3. BRUYNOGHE, R., 1926 — *In* EMMETT, J., 1950.
4. CHIARI, E.; MANSUR NETO, E. & BRENER, Z. — Some effects of gamma radiation on *Trypanosoma cruzi*, culture and blood forms. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:131-137, 1968.
5. COLLIER, W. A. — 1931 — *In* CULBERTSON, J. T. & KOLODNY, M. H. — Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasit.* 24:83-90, 1938.
6. DIAS, E. — Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 28: 1-110, 1934.
7. DUXBURY, R. E. & SADUN, E. H. — Resistance produced in mice and rats by inoculation with irradiated *Trypanosoma rhodesiense*. *J. Parasit.* 55:859-865, 1969.
8. EMMETT, J. — Effect of X-radiation on *T. cruzi*. *J. Parasit.* 36:45-47, 1950.
9. GONZÁLEZ-CAPPA, S. M.; SCHMUÑIS, G. A.; TRAVESA, O. C.; YANOVSKY, J. F. & PARODI, A. S. — Complement fixation tests, skin tests, and experimental immunization with antigens of *T. cruzi* prepared under pressure. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 17: 709-715, 1968.
10. HALBERSTAEDTER, L., 1914 — *In* EMMETT, J., 1950.
11. HALBERSTAEDTER, L. — The effect of X Rays on Trypanosomes. *Brit. J. Radiol.* 11:267-269, 1938.
12. JOHNSON, P.; NEAL, R. A. & GALL, D. — Protective effect of killed trypanosome vaccines with incorporated adjuvants. *Nature* (London) 4901:83, 1934.
13. MARTINEZ-SILVA, R.; LOPES, V. A.; COLÓN, J. I. & CHIRIBOGA, J. — *Trypanosoma cruzi*: effects of gamma radiation on growth and infectivity. *Exp. Parasit.* 25:162-170, 1969.
14. MAYER, M. & ROCHA LIMA, H., 1914 — *In* DIAS, E., 1934.
15. MENEZES, H. — The effect of phenolated "vaccines" against experimental *T. cruzi* infection in mice. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 2:59-66, 1968.
16. MENEZES, H. — Lesões histológicas em camundongos "vacinados" com uma cepa avirulenta de *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Med.* 25: 160-165, 1968.
17. MENEZES, H. — Imunização de camundongos com vacina viva avirulenta de *T. cruzi*. II — Ensaio da avaliação do tempo de eficiência da vacina. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 4:1-9, 1970.
18. MENEZES, H. & ALBUQUERQUE, R. D. R. — Imunização de camundongos com "vacina" viva avirulenta de *T. cruzi*. III — Variação do meio de cultura. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 4:69-74, 1970.
19. PATEL, V. C., 1936 — *In* EMMETT, J., 1950.
20. PESSÔA, S. B. — *Parasitologia Médica*. 8.ª edição. São Paulo, Editora Guanabara Koogan, 1972, págs. 237-238.
21. PIZZI, P. T. & PRAGER, S. R. — Inmunidad a la sobre infección inducida mediante cultivos de *T. cruzi* de virulência atenuada. *Bol. Inf. Parasit. Chil.* 7:20-21, 1952.
22. SANDERS, A. & WALLACE, F. G. — Immunization of rats with irradiated *T. lewisi*. *Exp. Parasit.* 18:301-304, 1966.
23. STUBBS, R. K.; BOBALIK, G. & ERCOLI, N. — Effect of X-Ray radiation on *Trypanosoma equiperdum* in vivo and in vitro. *J. Infect. Dis.* 102:34-43, 1958.
24. WARREN, L. G., 1957 — *In* WARREN, L. G. & BORSOS, T. — Studies on immune factors occurring in sera of chickens against the crithidia stage of *T. cruzi*. *J. Immun.* 82:585-590, 1959.

Recebido para publicação em 28/7/1972.