

Modificação da virulência do vírus do mixoma provocada pelos raios X

pelo

Dr. F. Rocha Lagôa

(com 5 figuras no texto)

O vírus do mixoma dos coelhos possui um conjunto de propriedades que tornam, a nosso ver, particularmente interessante seu estudo. Assim temos:

a) — uma elevadíssima virulência para o animal sensível, bastando um único corpúsculo elementar para — na opinião de PARKER (8), que realizou pesquisas estatísticas sôbre o assunto — obtermos uma infecção que evolui sempre fatalmente;

b) — contágio fácil, pois transmite-se diretamente pelo convívio em comum com animal enfêrmo, ou pela simples presença em local anteriormente ocupado por animal infetado ou, ainda, pela transmissão através de insetos, como demonstrou ARAGÃO (1);

c) — especificidade absoluta para a espécie sensível, pois sômente o coelho doméstico se infeta, ou então o coelho silvestre (*Silvilagus mienensis*), ainda conforme demonstrou ARAGÃO (2);

d) — a curiosa propriedade citocinética que lhe faculta induzir multiplicações anormais em células oriundas do tecido mesodérmico, o que determina o aparecimento, nas lesões, de células típicas, chamadas “mixomatosas”, onde se encontra um tipo de multiplicação (pseudomitose) semelhante às também presentes em certos tumores humanos, conforme verificações de MAGARINOS TORRES (8);

e) — ausência de, até o presente momento, qualquer tipo de vacina eficaz para a proteção dos animais sensíveis, falhando todos os processos físicos e químicos habitualmente empregados em outros vírus e bactérias para a obtenção de vacinas. A inativação do vírus por qualquer desses agentes é sempre acompanhada da perda de sua antigenicidade (10).

A ausência, na bibliografia consultada, de qualquer referência a respeito da ação dos raios X sôbre o vírus do mixoma, induziu-nos a encetar o presente estudo, conhecida que é a capacidade dessas radiações de provocarem singulares modificações em animais (6), bactérias (4), enzimas e vírus (3).

Pareceu-nos que o estudo da ação desse agente físico sôbre o vírus do mixoma poderia nos proporcionar interessantes perspectivas para o conhecimento das variações de sua virulência, tornando-se assim pos-

sível, graças à ação dissociativa dessas radiações, a obtenção de mutantes sem virulência, mas com poder antigênico íntegro, que seriam as condições ideais para obtenção de uma vacina eficaz contra a moléstia.

MATERIAL E MÉTODOS

O vírus do mixoma por nós utilizado foi purificado por uma técnica ligeiramente modificada da proposta por RIVERS e WARD (9), e que consiste no seguinte: o vírus, inoculado por escarificação no dorso epilado de coelhos, é colhido no quinto dia da inoculação da moléstia, retirando-se cuidadosamente o tecido mixomatoso da pele do animal doente, que é então triturado em gral estéril com alundum, adicionando-se ao ao mesmo uma solução-tampão de fosfato monopotássico Sorensen pH=7,1:10ml. para cada; após centrifuga-se o material repetidas vezes em distintas velocidades afim de obter-se a deposição das impurezas existentes. Em seguida, seca-se o material no vácuo, em baixa temperatura, obtendo-se assim um pó, forma sob a qual foi o mesmo submetido à ação dos raios X. A dosagem do vírus procedida no material assim preparado titulou 1×10^{-6} , conforme vê-se no gráfico I.

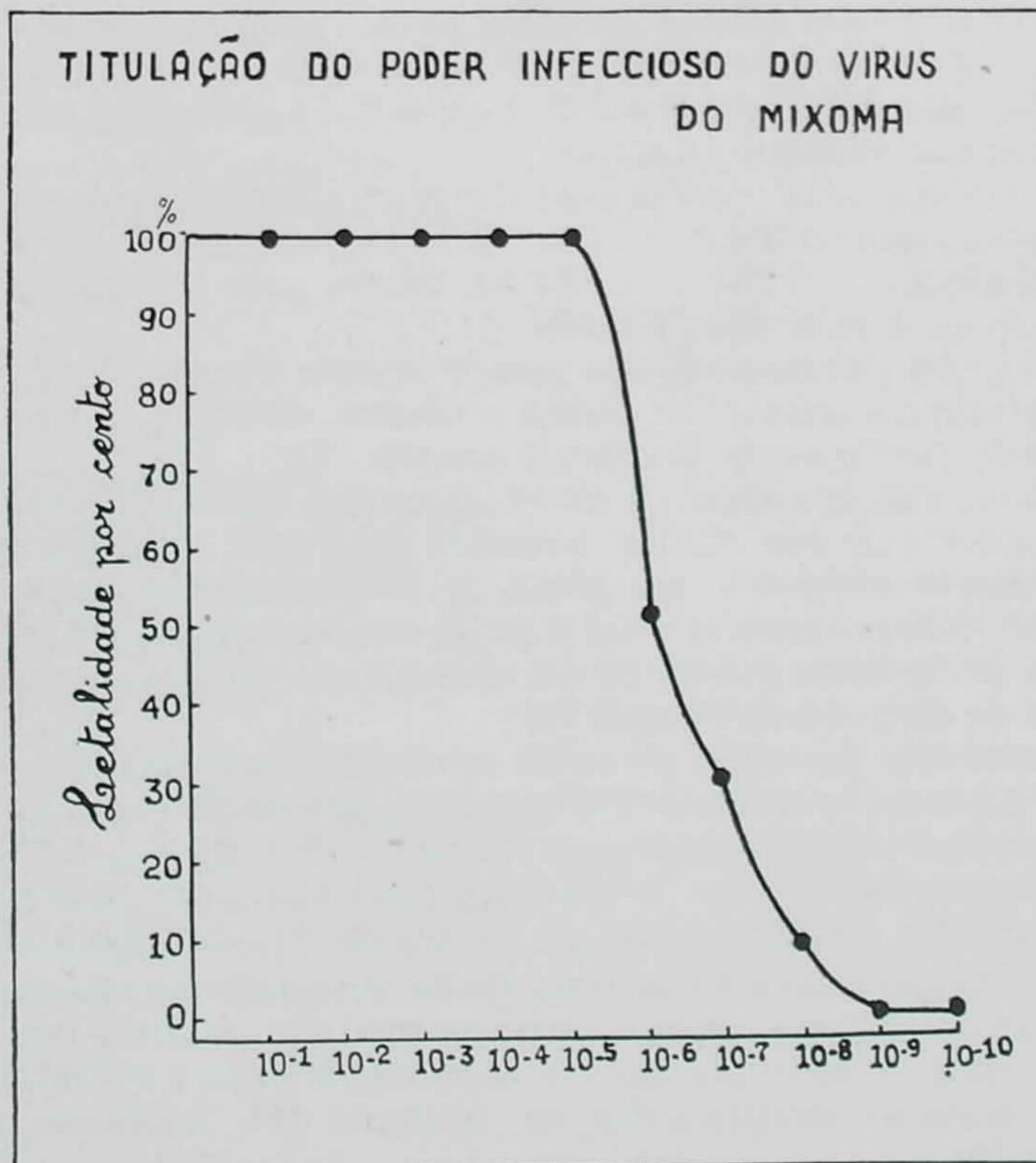


Gráfico I

O aparelho empregado para a produção de raios X foi um especial para contatoterapia, gentilmente cedido para este estudo pelo Dr. XA-

VIER DE OLIVEIRA, da "Philips S.A.", e que nos forneceu um rendimento de 1 400 r por minuto na distância de 3 cm, que foi a deixada entre a ampola e o material a irradiar. A aferição foi realizada por aparelho Victoreen com câmara para 2 500 r. O comprimento de onda das radiações fornecidas pelo aparelho foi de 0,247 Å. O material, ao ser irradiado, encontrava-se em uma pequena placa de Petri, repousando sobre gelo, assegurando-se assim uma baixa temperatura durante a irradiação. O material, imediatamente após cada uma das irradiações — que foram intervaladas, — era depositado no refrigerador a -20°C , sendo efetuada uma suspensão no momento de ser utilizado em solução-tampão de $\text{pH} = 7,1$, usando-se a diluição de 1×10^{-1} , que era a inoculada no dorso epilado de coelhos, postos em observação, em isolamento adequado.

RESULTADOS

O vírus não revelou alterações em sua virulência até a dose de raios X incidida atingir a cifra de 294 000 r. Verificou-se, então, que nem todos os animais inoculados adquiriram a moléstia, evoluindo também a mesma, em alguns dos atacados, sob forma diversa da clássica, isto é, muito mais lentamente. A incidência de raios X, ao atingir a concentração de 378 000 r, fêz cessar por completo a atividade patogênica do vírus, o que nos mostrou encontrar-se ele inativado. No entanto, antes de alcançarem-se êsses resultados, a incidência da moléstia nos animais inoculados já se mostrava variável, alguns enfermando e outros não, como mostram os gráficos II e III.

CURVA DE INATIVAÇÃO DO VIRUS DO MIXOMA PELOS RAIOS X

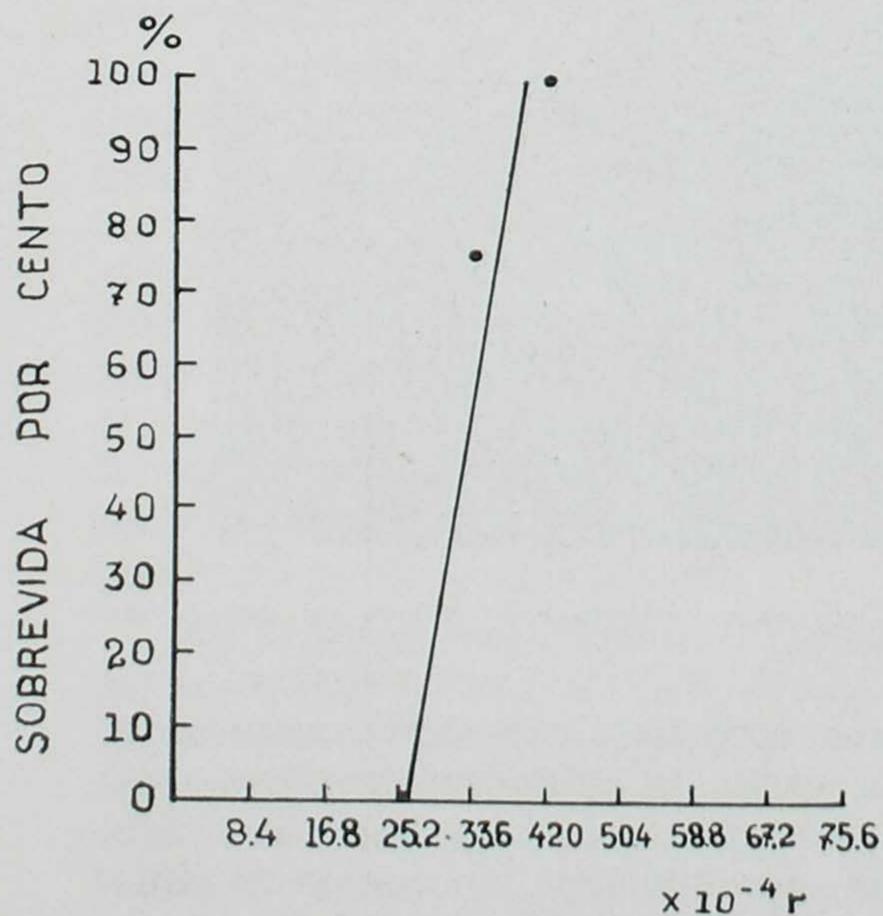


Gráfico II

CURVA DE INATIVAÇÃO DO VIRUS DO MIXOMA PELOS RAIOS X

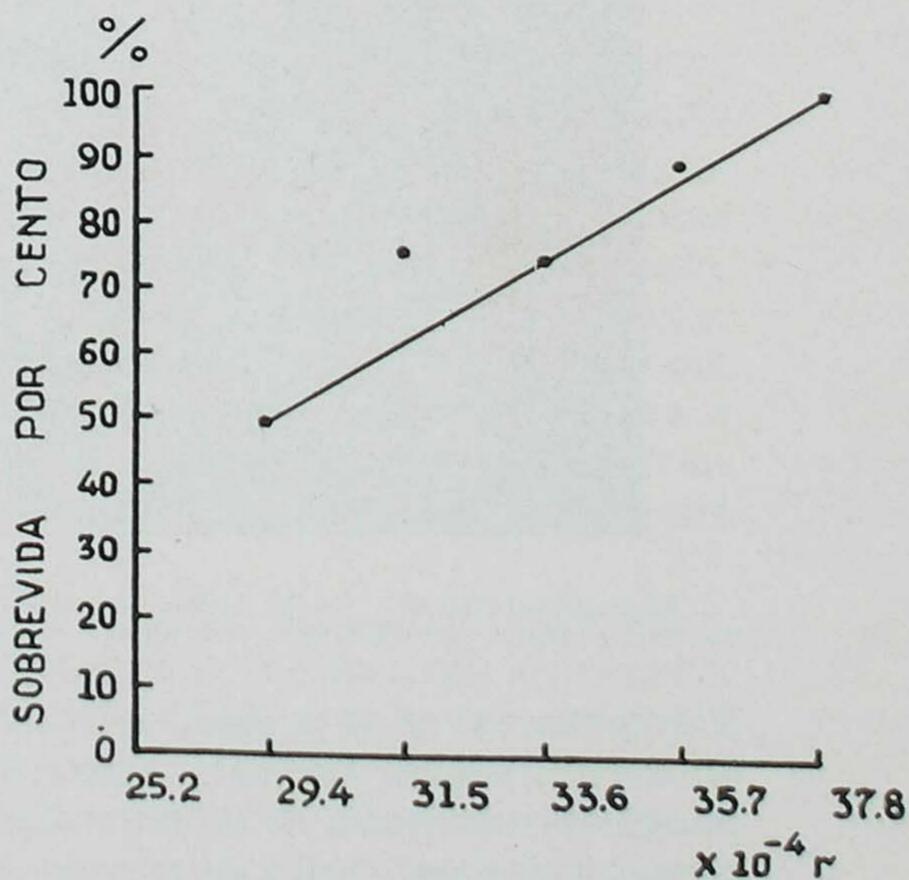


Gráfico III

Os animais que contraíam a moléstia, quando inoculados com vírus irradiados com cifras menores que a última referida, apresentaram a moléstia com evolução extraordinariamente mais lenta que a dos testemunhos. Nestes, a doença evoluía sempre fatalmente de 8 para 9 dias, enquanto que nos inoculados com vírus irradiado, entre 24 e 26 dias, o que revelou a existência de nítida atenuação da virulência do vírus.

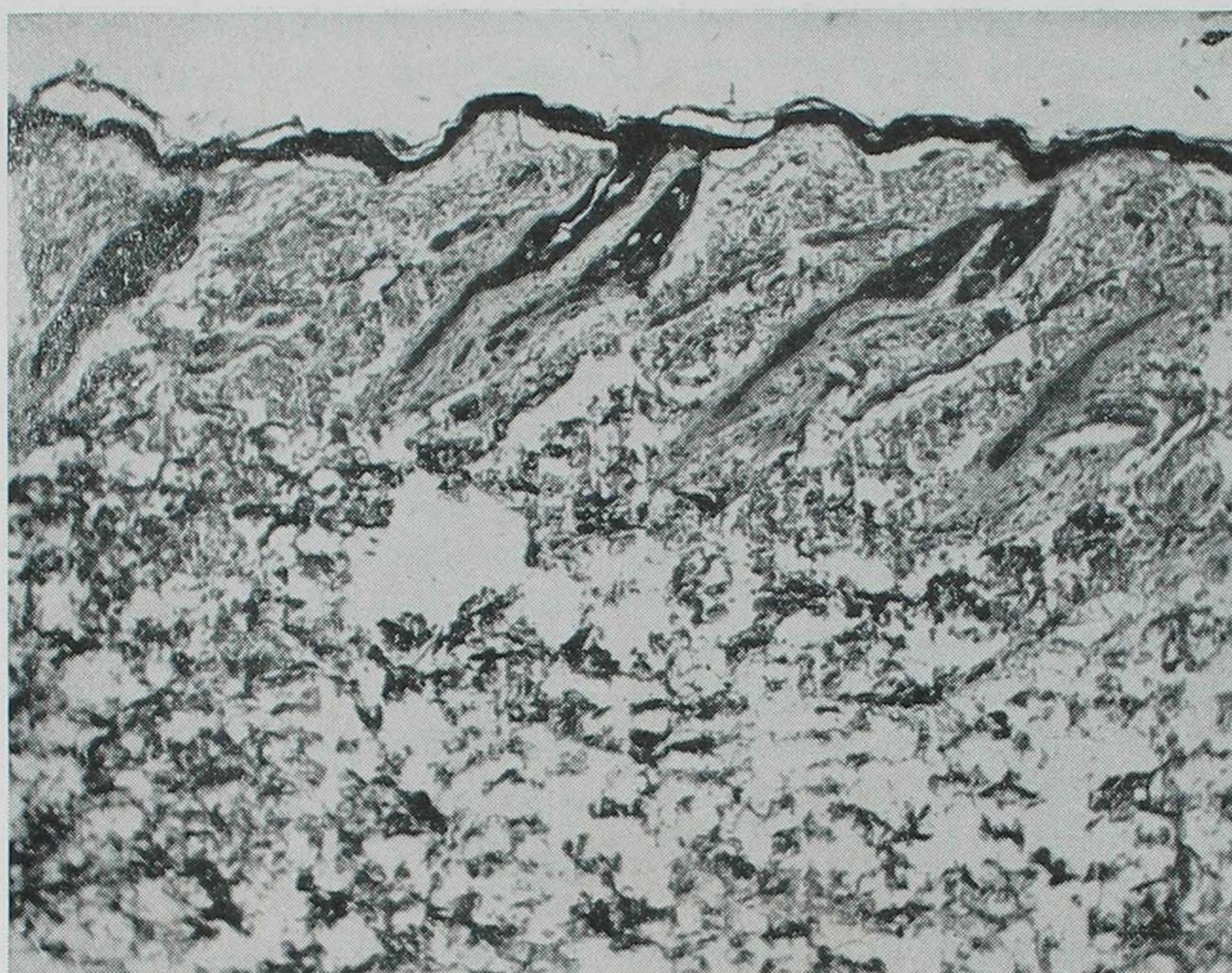
Concordando com essas manifestações, as lesões mixomatosas encontradas nesses animais macroscopicamente ou pelo exame histopatológico, foram muito mais discretas e menos extensas que as existentes nos testemunhas, como verifica-se pelas microfotografias IV e V.

A fig. IV corresponde a material colhido no ponto de inoculação da pele do coelho infetado com vírus normal e colhido no 8.º dia de evolução da moléstia, e a fig. V, a material colhido no ponto de inoculação (na região em que a lesão é mais intensa), proveniente de animal inoculado com vírus irradiado com 357 000 r e no 24.º dia de evolução da moléstia.



Microfotografia IV. — As lesões do mixoma ocupam extensão considerável no derma, são aparentes lesões da epiderme (necrose e espongiose).

Na figura IV vê-se a lesão de mixoma ocupando extensão considerável do derma, sendo também aparentes lesões da epiderme (necrose e espongiose); as lesões de mixoma típicas verificadas na fig. V são, contudo, menos extensas, tanto no derma como na epiderme, do que as demonstradas na fig. IV.



Microfotografia V. — Lesões de mixoma no derma discretas em relação às demonstradas na figura anterior. Nota-se ainda que as lesões da epiderme são menos intensas.

Devemos acrescentar que ambas provêm de regiões comparáveis, ou seja, daquelas em que mais acentuadas nos pareceram ser às lesões macroscópicas.

A evolução da moléstia em alguns animais inoculados com vírus, irradiado com as concentrações de 336 000 e 357 000 r, foi também muito mais lenta que a habitual, aparecendo os primeiros sintomas da moléstia nos 15.^o e 16.^o dias, sendo tôdas as manifestações mais discretas até alcançarem seu ápice nos 24.^o dias, quando os animais morriam, com mixoma generalizado. No entanto, o tumor no ponto de inoculação, nessa ocasião, apresentava ainda proporções sempre bastante menores que o dos testemunhas, cujos primeiros sintomas surgem do 4.^o para o 5.^o dia, agravando-se rapidamente a moléstia, vindo o animal a morrer, sistematicamente, nos 8.^o-9.^o dias com mixoma generalizado e grande tumor no ponto de inoculação.

Os animais sobreviventes, inoculados com vírus irradiado 378 000 r, portanto com vírus inativado, foram submetidos, 7 dias após a primeira inoculação, a outra inoculação em idênticas condições; transcorridos 7 dias mais, a uma 3.^a inoculação, e ao alcançar o 30.^o dia da primeira inoculação, foram inoculados com vírus com virulência íntegra adquirindo todos, no entanto, a moléstia com evolução clássica e caracteres típicos, o que nos revelou não conservar o vírus do mixoma inativado pelos

raios X as suas propriedades antigênicas, não protegendo, portanto, os animais aos quais são inoculados, contra uma inoculação posterior de vírus virulento.

A nosso ver, uma vacina eficaz contra a moléstia poderá ser obtida quando se conseguir uma atenuação da virulência do vírus em grau suficiente para que as lesões provocadas pela sua inoculação sejam sem conseqüências nocivas para o organismo inoculado. Esta atenuação deverá, no entanto, permitir a integridade do poder antigênico do vírus, isto é, a sua capacidade de despertar reações favoráveis no organismo ao qual é inoculado.

Acreditamos ser possível a obtenção do vírus nessas condições, através da ação favorável dos raios X, dependendo a concretização desses fatos apenas de serem superadas algumas dificuldades técnicas, como a separação do vírus suficientemente atenuado dos demais pouco atenuados, com a virulência íntegra ou completamente inativados. Presentemente, prosseguimos nessas pesquisas, esperando em breve alcançar algum resultado.

CONCLUSÕES

1) — os raios X são capazes de provocar modificações na virulência do vírus do mixoma, atenuando-a ou abolindo-a, conforme sejam as doses, não tendo sido conseguidas, no entanto, variantes do vírus;

2) — o vírus do mixoma inativado pelos raios X não conserva suas propriedades antigênicas, não conferindo, portanto, aos animais nos quais são inoculados, uma proteção eficaz contra a infecção mixomatosa;

3) — a interpretação dos fatos observados através da teoria do tiro certo (Treffer theorie), proposta por JORDAN (5), parece-nos perfeitamente aplicável ao presente estudo e elucidativa dos fatos observados;

a) — os elementos com virulência modificada seriam os atingidos em zona não vital mas suficientemente importante para influenciar a sua virulência;

b) — os vírus inativados foram os atingidos em zona vital;

c) — a incidência da moléstia, algumas vezes com características típicas, em animais inoculados com vírus irradiado, mesmo com elevadas doses de raios X, seria conseqüência da presença de vírus não atingidos pelas radiações ou atingidos apenas em zonas não importantes, sem influência sobre sua virulência.

4) — o vírus exposto à ação dos raios X determinam lesões macro e microscópicas no ponto de inoculação evidentemente menos extensas e intensas do que as da doença típica, embora conservando elas os mesmos caracteres essenciais.

5) — a atenuação da virulência do vírus do mixoma obtida pelos raios X indica-nos a possibilidade de vir a obter-se uma vacina eficaz contra a moléstia, utilizando-se esta ação favorável.

SUMÁRIO

Foi estudada a ação dos raios X sobre o vírus sêco do mixoma dos coelhos. Ao atingir a incidência dos raios X a concentração de 294.000 r até 378.00, quando desapareceu toda a atividade patogênica do vírus, nem todos os animais inoculados adquiriam a moléstia, passando a evoluir a mesma em alguns desses animais de forma muito mais lenta que a presente nas testemunhas. Concordando com esta sintomatologia, o exame histopatológico do material colhido no ponto de lesão mais intensa de animais atacados com mixoma de evolução lenta, revelou a existência de lesões menos extensas e intensas que aquelas presentes nos animais inoculados com o vírus normal, o que mostra terem os raios X determinado uma diminuição da virulência do vírus do mixoma, mas não uma mutação.

Os animais inoculados sucessivamente com vírus irradiado acima de 378.000 r, portanto inativados, foram, após 30 dias, inoculados com vírus de virulência íntegra, adquirindo, no entanto, a infecção mixomatosa com todos os caracteres típicos, o que revelou não conservar o vírus do mixoma inativado pelos raios X as suas propriedades antigênicas, não conferindo, portanto, proteção contra inoculações posteriores de vírus mixomatoso virulento.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ARAGÃO H. B. — 1927
O mixoma dos coelhos
Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 20:25.
- 2) ARAGÃO H. B. — 1943
O vírus do mixoma no coelho do mato
Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 38:93.
- 3) LÉA D. SMITH K. M. HOLMER B. MARKLAN R. — 1944
Direct and indirect actions of radiations on viruses and enzymes.
Parasitology, 36:110.
- 4) HABERMAN S. ELLWORTH — 1939
The effect of X-rays on the dissociative rates of certain bacteria
J. Bact., 38:237.
- 5) JORDAN P. — 1938
Über die Elementarprogreße der biologischen Strahlenwirkung
F. Radiológica 2 (12):17.

- 6) MULLER J. H. — 1928
The production of mutations by X-rays
Proc. Nat. Acad. Sci., 14:714.
 - 7) MAGARINOS TORRES C. B. — 1944
Sôbre a hiperplasia celular no mixoma infectuoso do coelho.
Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 41:283.
 - 8) PARKER R. — 1940
Studies of the infectious unit of myxoma
J. Exp. Med. 71:243.
 - 9) RIVERS T. M. & WARDIS M. — 1937
Infectious myxomatosis of rabbit. Preparation of elementary bodies and studies of serologically active materials associated with the disease
J. Exp. Med., 66:1.
 - 10) ROCHA LAGÔA F. — 1947
Considerações sôbre o mixoma dos coelhos e suas relações com os tumores humanos.
A propósito da etiologia do câncer.
Brasil-Médico 51-52:3.
-