

AÇÃO DE RAIOS GAMA SOBRE FORMAS SANGUICOLAS DE *TRYPANOSOMA* CRUZI. ESTUDO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Gentilda K. F. TAKEDA (1), Rubens CAMPOS (1), Julio KIEFFER (2), Antonio Augusto B. MOREIRA (3), Vicente AMATO NETO (3), Vera Lúcia P. CASTILHO (3), Pedro Lutz S. PINTO (3) e Maria Irma Seixas DUARTE (3)

R E S U M O

Amostras de sangue de animais infectados com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram submetidas, respectivamente, a 200 e 300 krad de radiação gama. Para verificar a eficácia do método na eliminação do parasita, o material foi inoculado em camundongos e os parâmetros utilizados na avaliação foram: parasitemia, cultura, xenodiagnóstico, subinoculação, reinoculação com cepa virulenta e exame anátomo-patológico das vísceras. Os sangues expostos às duas diferentes intensidades de radiação e inoculados em dois períodos após o processo, mostraram-se inócuos quanto a capacidade de produzir infecção nos animais

UNITERMOS: Doença de Chagas — Camundongos — Raios Gama

I N T R O D U Ç Ã O

O risco da veiculação de agentes parasitários e infecciosos se constitui num dos problemas da hemoterapia. Em nosso meio, o mecanismo transfusional vem se tornando cada vez mais importante como forma alternativa da transmissão de Doença de Chagas^{10,11}. Serviços de hemoterapia têm utilizado recursos vários visando a prevenção da transferência do agente causal, o flagelado *Trypanosoma cruzi*, através de sangue e seus derivados ou componentes. Com esta finalidade, a seleção rigorosa dos doadores, através quer de interrogatório minucioso quanto a dados epidemiológicos, quer de realização de testes sorológicos específicos nem sempre é viável ou tem-se mostrado eficaz. Assim que, o emprego de tripanossomicidas adicionados ao sangue passa a representar o recurso recomendado e adotado em circunstâncias especiais. A violeta de genciana a 1/4.000 adicionada ao sangue a ser transfundido é o método classicamente utilizado no nosso país^{8,9}, constituindo recurso útil e válido

na maioria das circunstâncias, a despeito de restrições que possa apresentar principalmente na superdosagem, onde os efeitos tóxicos poderiam estar presentes além da inconveniência de alterar a coloração da pele. Tem sido preocupação dos hematologistas, utilizando métodos bioquímicos modernos, o dimensionamento de possíveis ações deletéricas, sobre o eritrócito, ocasionados pela adição de substâncias diversas ao sangue, assim como a avaliação do risco da potencial toxicidade para o receptor. Recentemente, a anfotericina B, antibiótico poliênico, mostrou-se eficiente como tripanossomicida³ tendo sido estudado o efeito de sua adição sobre o sangue armazenado¹.

Voltados para o uso de agentes físicos, a literatura mostra várias iniciativas^{2,4,5,6,12,13} visando verificar a ação dos mesmos sobre *T. cruzi* em especial o uso de radiações atendo-se, todavia, no estudo das alterações na infectividade e na ação patogênica do microrganismo,

(1) Dept.º de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

(2) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares — Comissão Nacional Energia Nuclear — IPEN-CNEN-SP

(3) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

procurando abrir novas perspectivas no campo da imunização.

Na tentativa de utilizar recurso de ordem física visando introduzir nova alternativa na profilaxia deste risco inerente à hemoterapia os autores propõem verificar a ação das radiações gama sobre as formas sanguíneas de *T. cruzi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sangue de camundongos inoculados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foi colhido por punção cardíaca usando-se seringas contendo heparina. Constituiu-se um "pool" que foi dividido em 3 alíquotas de 2 ml (I, II e III). Foram sangrados pela mesma via camundongos não infectados cujos sangues constituíram a alíquota IV.

As alíquotas de sangue foram acondicionadas em bolsas plásticas e fechadas hermeticamente com o calor.

As amostras I e II receberam radiação realizada mediante fonte de ^{60}Co Gammacell — 220 (Atomic Energy Commission of Canada, Ltd) com atividade e por duração tais a liberar 200 krad. e 300 krad., respectivamente. A amostra III que também continha formas flageladas e que não recebeu radiação foi considerada o controle positivo. A alíquota IV recebeu 200 krad. e se constituiu no controle negativo quanto a presença de protozoário.

A parasitemia das alíquotas I, II e III foi quantificada uma e 24 horas após irradiação. Desta forma as alíquotas foram desdobradas em 6 amostras (I, IA, II, IIA, III e IIIA) que juntamente com o material negativo (amostra IV) passaram a constituir os inóculos.

De um total de 56 animais obtiveram-se 7 lotes de camundongos albinos com 20 dias de idade, de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

No Quadro I estão especificados os processamentos a que foram submetidos os 7 grupos de animais.

Os lotes assim constituídos, de início, foram analisados numa primeira etapa de acordo com os seguintes parâmetros:

QUADRO I

Intensidade de radiação, tempo decorrido entre radiação e inoculação (T) e número de tripomastigotas inoculados

Lote	Radiação		N.º de tripomastigotas inoculados
I	200 krad.	01 hora	169.900
IA	200 krad.	24 horas	78.700
II	300 krad.	01 hora	125.700
IIA	300 krad.	24 horas	27.800
III	—	01 hora	223.100
IIIA	—	24 horas	180.400
IV	200 krad.	24 horas	—

- 1 — Pesquisa do agente através do exame direto de sangue colhido da cauda dos animais inicialmente a cada 24 horas e após 2 meses a cada semana.
- 2 — Xenodiagnóstico aplicado 2 semanas após a inoculação, utilizando-se para cada animal 5 ninfas de 3.º estágio de *Triatoma sordida*.
- 3 — Mortalidade.

Decorridos 3 meses, em uma segunda etapa, os sobreviventes foram subdivididos em dois grupos para cada lote e a avaliação prosseguiu-se adotando-se os seguintes critérios:

Para o primeiro grupo de cada lote constituído por 4 animais foram feitos:

- Xenodiagnóstico (5 ninfas de 3.º estágio — *T. sordida*).
- Semeaduras em meio Warren (5 tubos).
- Subinoculação em 3 camundongos.
- Exame anátomo-patológico de vísceras.

No outro grupo os animais restantes receberam "challenge" com cepa virulenta de *T. cruzi* com o propósito de demonstrar uma possível resistência adquirida evidenciada pela parasitemia e mortalidade. Estes dados foram confrontados com os correspondentes relativos a camundongos "limpos" inoculados com a mesma cepa.

RESULTADO

No Quadro II figuram os resultados, correspondentes à infecção e mortalidade para cada lote de animais, obtidos na primeira etapa dos experimentos.

Q U A D R O II
Infecção e mortalidade dos lotes de animais

Lote	N.º de camundongos inoculados	Camundongos infectados		Camundomos mortos	
		N.º	(%)	N.º	(%)
I	08	0	0,0	1	12,5
IA	08	0	0,0	0	0,0
II	08	0	0,0	1	12,5
IIA	08	0	0,0	1	12,5
III	08	8	100,0	8	100,0
IIIA	08	8	100,0	6	75,0
IV	08	-	-	1	12,5

Os resultados dos xenodiagnósticos foram negativos nos lotes irradiados. Para os controles positivos III e IIIA foram dispensados a realização do xenodiagnóstico e hemocultura nas duas etapas da experimentação.

Na segunda etapa, após a subdivisão dos remanescentes de cada lote, constatou-se, para o 1.º grupo, a persistência de negatividade do xenodiagnóstico e da hemocultura. A subinoculação resultou positiva para os animais provenientes do lote IIIA não irradiado. Para o lote III tal observação não pode ser feita dada a mortalidade (100%).

Neste mesmo grupo o exame anátomo-patológico das vísceras revelou que em apenas um animal do lote IIA inoculado com sangue irradiado foi encontrado no citoplasma de células macrofágicas do fígado, estruturas semelhantes às leishmanias, sem que todavia se pudesse identificá-las seguramente como formas amastigotas. Em todas as demais preparações dos diversos lotes notou-se ausências de parasitismo, ressaltando-se o encontro de focos de infiltrado de células mononucleares no miocárdio e endocárdio dos animais (lote IIA). Como manifestações provavelmente intercorrentes notou-se o aparecimento de formações tumorais subcutâneas no dorso de 3 animais subinoculados e cegueira em 2 casos (lotes IA e IIA).

Ainda na 2.ª etapa, os animais restantes de cada lote e que constituíram o 2.º grupo, após o "challenge", aqueles provenientes dos lotes irradiados mostraram-se positivos para *T. cruzi* em contraste com o observado com os não submetidos à irradiação.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos permite supor como efetiva a ação das radiações gama em ambas as dosagens adotadas, no sentido de esterilizar sangue comprovadamente contaminado por *T. cruzi*. Os diversos parâmetros dão resposta a essa conclusão, ressalva a ser feita no estudo anátomo-patológico, onde o encontro de dado controverso demanda novas experimentações. A hemocultura que seria outro método indicado para o isolamento do *T. cruzi*, embora tivesse sido realizada, não forneceu resultados, em decorrência de falha técnica.

As manifestações secundárias observadas não parecem guardar relação de causa e efeito com a inoculação do material irradiado. Torna-se evidente a necessidade de trabalho subsequente visando aquilatar a influência possível das radiações tanto sobre os componentes do sangue como sobre o receptor. Todavia nossas observações preliminares tem o mérito indiscutível de acenar com perspectiva alvissareira de um outro recurso que poderá vir a ser padronizado na profilaxia da Doença de Chagas pós-transfusional pelos serviços de hemoterapia.

SUMMARY

Action of gamma radiation on blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Experimental study in mice

Blood samples of animals infected with *T. cruzi* — Y strain, were submitted to gamma radiation in dosage of 200 and 300 krad.

In order to verify the efficacy of this method to eliminate the parasite the blood samples were inoculated in to mice and the following parameters were used: parasitemia, hemoculture, xenodiagnosis, subinoculation, reinoculation of mice with a virulent strain and anatomy pathological study.

The blood samples exposed to the different radiation dosages and inoculated at two different periods were unable to induce a subsequent infection in all animals tested.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRETO, O. C. D. O. P.; AMATO NETO, V.; CASTILHO, E. A.; MOREIRA, A. A. B.; NONOYAMA, K.; TANAKA, O.; SAWASTANI, E.; PINTO, P. L. S.;

- OKUMURA, Y. & CAMPOS, R. — Efeito da anfotericina B sobre a viabilidade eritrocitária. Perspectiva do seu uso na prevenção da Doença de Chagas induzida pela transfusão de sangue. *Rev. Paul. Med.* 101: 212-216, 1983.
2. 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.
 3. CRUZ, F. S.; MAVI, J. J. & BERENS, R. L. — Prevention of transfusions induced Chagas disease by amphotericin B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 761, 1980.
 4. EMMETT, J. — Effect of X radiation on *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasit.* 3: 45-47, 1950.
 5. HALBERSTAEDTER, L. — The effect of X-rays on trypanosomes. *Brit. J. Radiol.* 11: 267-269, 1938.
 6. HANSON, W. L.; CHAPMAN Jr., W. L. & WAITS, V. B. — Immunization of mice with irradiated *Trypanosoma cruzi* grown in cell culture: relation of numbers of parasites, immunizing injections and route of immunization to infection. *Int. J. Parasitol.* 6: 341-347, 1976.
 7. NUSSENZWEIG, V.; BIANCALANA, A.; AMATO NETO, V.; SONNTAG, R.; FREITAS, J. L. P. & KLOETZEL, J. — Ação da violeta de genciana sobre o *T. cruzi* "in vitro" e sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão. *Rev. Paul. Med.* 42: 57-58, 1953.
 8. NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; FREITAS, J. P. L.; AMATO NETO, V. & KLOETZEL, J. — Ação de corantes trifenil-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro" emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. *Hospital (Rio)* 44: 731-744, 1953.
 9. NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; FREITAS, J. L. P.; AMATO NETO, V.; BIANCALANA, A. & KLOETZEL, J. — Ação de agentes físicos e químicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro". *Hospital (Rio)* 45: 589-599, 1954.
 10. NUSSENZWEIG, V.; AMATO NETO, V.; FREITAS, J. P. L.; NUSSENZWEIG, R. S. & BIANCALANA, A. — Moléstia de Chagas em bancos de sangue. *Rev. Hosp. Clin.* 10: 265-283, 1955.
 11. RASSI, A. & REZENDE, J. M. de — Prevention of transmission of *T. cruzi* by blood transfusion. In *New Approaches in American Trypanosomiasis Research Proceedings of an International Symposium — Belo Horizonte. M.G. Brasil 18-21 march 1975. Scientific publication n.º 318 P.A.H.O. Washington, p. 237-278, 1976.*
 12. REZENDE, J. M. de; ZUPELLI, W. & BAFUTO, M. G. — Os problemas da transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. Emprego da violeta de genciana como medida profilática. *Rev. Goiana Med.* 11: 35, 1965.
 13. SILVA, R. M.; LOPEZ, V.; CHIRIBOGA, J. & COLÓN, J. I. — Effect of irradiation on *Trypanosoma cruzi*. *Radiat. Res.* 31: 649, 1967.
 14. TOMLINSON, M. J.; CHAPMAN Jr., W. L.; HANSON, W. Z. & GOVER, A. J. — The effect of irradiated *Trypanosoma cruzi* on the pathogenesis of Chagas disease in dogs. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 22: 219-230, 1980.

Recebido para publicação em 28/1/1985.