



EFEITOS DE RAIOS GAMA SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

II — Anticorpos em camundongos inoculados com formas de cultura

Ednir SALATA (1), Maria Aparecida BARBOSA (1) e Fernando M. A. CORRÊA (2)

RESUMO

Testes de imunofluorescência indireta foram realizados em soro e eluatos de sangue de camundongos inoculados com diferentes doses de formas de cultura de *Trypanosoma cruzi* submetidos ou não a 90 krad de raios gama. Formas não irradiadas de cultura foram imunógenas mais eficientes que as formas irradiadas. Cerca de 75% dos animais inoculados com formas não-irradiadas apresentaram título igual ou superior a 1/16, sendo o maior 1/64.

INTRODUÇÃO

DUXBURY & SADUN³, utilizando imunofluorescência, demonstraram anticorpos circulantes em soro de ratos imunizados com *Trypanosoma rhodesiense* irradiados.

POTHIER & col.⁴ detectaram, por imunofluorescência indireta, anticorpos específicos para *Trypanosoma cruzi* em camundongos previamente inoculados com 1×10^6 formas epimastigotas obtidas de cultura.

Em trabalho anterior⁵, demonstramos que camundongos inoculados com formas de cultura de *Trypanosoma cruzi* irradiadas com 90 krad não foram protegidos contra reinoculação com formas sanguíneas não irradiadas, ao contrário do que ocorre quando da inoculação de formas de cultura não irradiadas.

No presente trabalho procuramos verificar se ocorre variação no título de anticorpos séricos de camundongos inoculados com formas de cultura, irradiadas e não-irradiadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Irradiação dos Parasitas

Hemoflagelados de cepa Y mantidos em meio de WARREN, foram irradiados com 90 krad através de uma fonte gama de Co-60, com uma atividade de 66,5 krad/hora, a 10 cm.

Esquema de Imunização

O meio de WARREN utilizado no presente trabalho foi de um único lote, que após seu preparo foi estocado a 4°C. Vários tubos foram semeados semanalmente a partir de um mesmo inóculo e após incubação a 28°C durante 7 dias, foram divididos em dois lotes sendo um deles submetido a radiação para posterior inoculação. A porcentagem das diferentes formas do protozoário não foi determinada.

Os esquemas de imunização utilizados foram os mesmos descritos anteriormente⁵, e estão sumariados na Tabela I.

Trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu

- (1) Professores Assistentes de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, São Paulo, Brasil.
- (2) Professor-Titular de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Soro Anti-T. cruzi

Sangue de camundongos imunizados foi semanalmente coletado em papel de filtro Whatman n.º 1, como preconizado por SOUZA & CAMARGO⁶, e estocado a -20°C até o momento do uso. Eluatos foram preparados com solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2, de modo a dar uma diluição do soro a 1/20.

Soro foi coletado aos 60 e 90 dias após a 1.^a dose imunizante e estocado a -20°C .

Antígeno

Formas de cultura de *T. cruzi* em meio de WARREN, mantidas a 28°C durante 7 dias, foram lavadas em salina fosfatada, 0,15 M pH 7,2. O sedimento foi ressuspensão na mesma salina contendo formalina a 2% e mantido a temperatura ambiente por cerca de 24 horas. Após centrifugar, o sedimento foi ressuspensão em salina fosfatada contendo dextrose a 6% e distribuído em lâminas quadradas².

Conjugado Antiglobulina de Camundongo

Apresentando um título de 1/80 e relação F/P igual a $7,2 \times 10^3$, foi gentilmente fornecido pelo Dr. MARIO CAMARGO.

Reação de Imunofluorescência

Diluições do soro ou eluatos foram incubadas sobre áreas antigênicas por 1 hora a 37°C .

Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas abundantemente com salina fosfatada.

A seguir as lâminas foram incubadas, em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, em presença do conjugado diluído a 1/80 em salina tamponada contendo azul de Evans a 0,001% como contraste.

Após nova lavagem das lâminas, por imersão em 3 trocas de salina tamponada, as mesmas foram montadas com auxílio de glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato pH 9,0 e examinadas ao microscópio.

RESULTADOS

Os testes de imunofluorescência indireta com eluatos a 1/20, coletados semanalmente, mostraram-se negativos durante 6 semanas consecutivas.

Os resultados com soros coletados aos 60 e 90 dias após a 1.^a dose imunizante encontram-se na Tabela II. Cerca de 75% dos animais inoculados com formas não-irradiadas apresentaram título igual ou superior a 1/16, enquanto apenas 10% dos inoculados com formas irradiadas apresentaram título de 1/16.

DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam que formas não-irradiadas de cultura de *T. cruzi* foram imunógenos mais eficientes que formas irradiadas.

TABELA I

Esquemas de imunização dos camundongos

| Lote | Número de animais | Número de doses imunizantes | Dias de intervalo entre as doses | Doses imunizantes |
|--------|-------------------|-----------------------------|----------------------------------|-------------------|
| A (*) | 10 | 2 | 30 | 100.000 |
| A (**) | 10 | 2 | 30 | 30.000 |
| B (*) | 10 | 4 | 7 | 100.000 |
| B (**) | 10 | 4 | 7 | 30.000 |

(*) Lotes que receberam formas irradiadas de cultura de *T. cruzi*

(**) Lotes que receberam formas não-irradiadas de cultura de *T. cruzi*

TABELA II

Titulos de imunofluorescência indireta com soros de camundongos inoculados com diferentes doses de *T. cruzi* irradiados com 90 krad e controles, aos 60 e 90 dias após a 1.^a dose imunizante

| Lote | Titulos após | | | | | | | | | |
|--------|--------------|------|------|------|------|---------|-----|------|------|------|
| | 60 dias | | | | | 90 dias | | | | |
| | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 |
| A (*) | (+)0/5(++) | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 3/5 | 2/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| A (**) | 1/5 | 0/5 | 4/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 |
| B (*) | 0/4 | 3/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 1/5 | 3/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 |
| B (**) | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 4/5 | 1/5 | 0/5 | 2/5 | 2/5 | 1/5 | 0/5 |
| C | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | — | — | — | — | — |

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

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

(+) Número de animais positivos

(++) Número de animais examinados

C Animais não inoculados

das. Entretanto, os títulos relativamente baixos observados nos lotes de camundongos inoculados com as formas não-irradiadas não justificam a imunidade parcial por nós observada anteriormente⁵.

Em consequência somos levados a admitir duas hipóteses para justificar aqueles resultados: 1) Anticorpos protetores seriam produzidos contra determinantes antigênicos do parasita porém não seriam detectáveis pela imunofluorescência; 2) A resposta imune mais eficiente estaria inversamente relacionada à dose estimulante, isto é, menor dose estimulante acarretaria resposta imune mais eficiente¹.

Estudos complementares devem ser realizados para que se tirem conclusões mais concretas a respeito do mecanismo envolvido na Doença de Chagas; sobre qual a melhor dose de imunógeno e qual a via de inoculação mais eficiente e como atua a radiação sobre o *T. cruzi*.

SUMMARY

Effects of gamma radiation on Trypanosoma cruzi. II — Antibody production in mice inoculated with culture forms

Antibody fluorescent tests were carried out with serum and blood eluates from mice inoculated with different doses of irradiated (90 krad) and non-irradiated *T. cruzi* culture forms.

Non-irradiated culture forms were more efficient immunogens than the irradiated ones. About 75% of the animals inoculated with non-irradiated forms showed titers equal or higher than 1/16, the highest one reaching 1/64.

AGRADECIMENTOS

Os Autores desejam externar seus agradecimentos ao Dr. MARIO E. CAMARGO, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo que gentilmente nos forneceu o conjugado antiglobulina de camundongo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRENER, Z. — Comunicação pessoal.
2. CAMARGO, M.E. — Preparation of microscopical slides to simplify immunofluorescent serological titrations. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:39-40, 1965.

SALATA, E.; BARBOSA, M. A. & CORRÊA, F. M. A. — Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi*. II — Anticorpos em camundongos inoculados com formas de cultura. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18:211-214, 1976.

3. DUXBURY, R.E. & SADUN, E.H. — Resistance produced in mice and rats by inoculation with irradiated *Trypanosoma rhodesiense*. *J. Parasit.* 25:859-865, 1969.
4. POTHIER, M.A.; SCHMUNIS, G.A.; VATTUONE, N.H.; TRAVERSA, O.C. & YANOVSKY, J.F. — Valeur diagnostique des différentes formes parasitaires dans la Trypanosomose américaine expérimentale em immuno-fluorescence chez la souris. *Ann. Parasit.* (Paris) 44:225-230, 1969.
5. SALATA, E.; WIENDL, F.M. & CORRÊA, F.M.A. — Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:66-71, 1973.
6. SOUZA, S.L. & CAMARGO, M.E. — The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:255-258, 1966.

Recebido para publicação em 18/6/1975.