
CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR

DE QUATRO CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*

ISOLADAS DE PACIENTES NA FASE CRÔNICA,

FORMA CARDÍACA DA DOENÇA DE CHAGAS

Maria Aparecida da Silva,¹ Gisele Alborguetti Nai² e João Aristeu da Rosa³

RESUMO

Com o objetivo de caracterizar quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos, procedentes de diversas áreas geográficas, residentes na região de Araraquara – SP, parâmetros biológicos e moleculares foram avaliados. As cepas foram denominadas AMJM, BFS, NBR e NCS. Para estudar o comportamento biológico das cepas, três grupos de camundongos *Swiss*, pesando 10-12g foram inoculados intraperitonealmente com formas sanguíneas das cepas em estudo. Foram avaliados os seguintes parâmetros: período pré-patente, curvas de parasitemia, morfologia do parasito no sangue periférico, taxas de mortalidade e lesões histopatológicas. Três cepas apresentaram parasitemia patente com períodos pré-patentes variáveis, baixa parasitemia e formas tripomastigotas largas durante todo o curso da infecção. Uma cepa apresentou parasitemia subpatente. Nenhuma das cepas ocasionou mortalidade nos animais inoculados. Estudo histopatológico mostrou ninhos de formas amastigotas no músculo cardíaco de animais infectados com as cepas AMJM e NBR. Observou-se reação inflamatória, variando de discreta a moderada, no músculo cardíaco para todas as cepas estudadas. Reação inflamatória nos músculos da parede intestinal foi observada somente nos camundongos infectados com a cepa BFS. Observou-se reação inflamatória nos músculos esqueléticos dos camundongos infectados com as cepas AMJM, BFS e NCS. Reação inflamatória no fígado foi observada para as cepas AMJM e NBR. Os parâmetros biológicos observados permitiram a classificação de todas as cepas no Biodema Tipo II. Para tipagem molecular o DNA do parasito foi extraído de formas epimastigotas mantidas em meio LIT. Parte do espaçador não transcrito do gene de minixon foi amplificado por meio de PCR. Produtos amplificados de 250 pb foram observados para todas as cepas. Os dados biológicos e moleculares permitiram a classificação destas cepas como *T. cruzi* II.

DESCRITORES: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Cepa. Biodema. PCR multiplex. *T. cruzi* II.

1 Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo (SP), Brasil.

2 Faculdade de Medicina, UNOESTE, Presidente Prudente, SP.

3 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP.

Endereço para correspondência: Maria Aparecida da Silva, Avenida Paulo Marcondes, 649, Bl. 3, Apt.º 202, CEP: 19025-000, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. E-mail: m.a.s@stetnet.com.br

Recebido para publicação em: 30/3/2006. Revisto em: 29/9/2006. Aceito em: 29/11/2006.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. É uma infecção exclusiva do continente americano e ocorre desde o sul dos Estados Unidos até Argentina e Chile. A Organização Mundial de Saúde estimou em 2002 que mais de 17 milhões de pessoas estivessem infectadas em toda a América e 92 milhões em risco de adquirir a infecção (43). Iniciativas multinacionais de erradicação têm tido resultados espetaculares, reduzindo significativamente a prevalência da doença (19). A Iniciativa do Cone Sul é uma intervenção governamental iniciada em 1991 com o objetivo de eliminar a transmissão da doença de Chagas na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Após essa intervenção, a transmissão da doença de Chagas pelo vetor e por transfusão de sangue foi interrompida no Uruguai em 1997; no Chile em 1999 e em 8 dos 12 estados brasileiros onde a infecção é endêmica em 2000. Conseqüentemente, a incidência de novas infecções em todo o continente decresceu mais de 70% (30).

O curso da infecção é bastante variável e apresenta uma fase aguda e outra crônica. A fase aguda é geralmente assintomática e apenas 1% a 2% dos pacientes apresentam sintomas em uma ou duas semanas após a infecção. As manifestações clínicas gerais incluem febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Essa fase se resolve espontaneamente em quatro a oito semanas. Entretanto, alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeficientes, podem apresentar quadros meníngeos graves e insuficiência cardíaca que podem levar a óbito (24, 35, 39).

Após quatro a dez semanas, inicia-se a fase crônica na sua forma indeterminada, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas significativas. Enquanto alguns pacientes permanecem nessa fase indefinidamente, outros, geralmente após intervalo de 10 a 20 anos, evoluem para alguma das formas crônicas sintomáticas da doença, com aparecimento de evidências de comprometimento cardíaco, digestivo ou neurológico (36).

A miocardite chagásica crônica caracteriza-se por um infiltrado de células mononucleares com destruição de fibras cardíacas no foco inflamatório e comprometimento dos plexos nervosos, o que leva ao aparecimento de áreas de fibrose no tecido cardíaco, fenômenos tromboembólicos e à morte súbita (2, 24).

A forma digestiva é caracterizada por alterações na secreção, na motilidade, na absorção e, nos casos mais graves, pelo aumento do tubo digestivo em conseqüência de alterações nos plexos nervosos, principalmente no plexo mioentérico, sendo o megaesôfago e o megacólon as formas mais comuns (22). A forma nervosa da doença de Chagas é caracterizada por manifestações neurológicas e déficit mental, provavelmente em razão de seqüelas da fase aguda. Essa forma é encontrada com mais freqüência em pacientes submetidos à imunossupressão ou infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (37).

A causa desse aspecto clínico variável da doença não é conhecida (6). A severidade e os sintomas variam em diferentes regiões geográficas. Já foi sugerido que tais variabilidades podem ser resultantes tanto da heterogeneidade entre isolados de *T. cruzi* como da resposta imune do hospedeiro (40). O táxon *T. cruzi* não é composto por uma espécie homogênea. Nos anos 1960, quando não se dispunha de métodos moleculares, Coura et al. (16) defenderam o uso do termo “complexo *cruzi*” para designar o protozoário, com base em: variação morfológica, aspectos imunológicos, distinta virulência e diferenças nos padrões individual e regional da doença de Chagas. Hoje está bem estabelecido que *T. cruzi* é uma espécie heterogênea, composta de várias subpopulações do parasito que circulam entre vários hospedeiros vertebrados, domésticos e silvestres e hospedeiros invertebrados (32, 44).

Segundo Andrade e Magalhães (4), cepas de *T. cruzi* são complexos de populações multiclonais que diferem em suas características genéticas e biológicas e em seu comportamento no hospedeiro vertebrado. Estudos experimentais mostram que diferentes cepas de *T. cruzi* podem determinar lesões tissulares peculiares na fase aguda, que surgem em consequência de um tropismo específico e predominante para diferentes tipos de células de mamíferos, tais como macrófagos, células musculares cardíacas e esqueléticas e neurônios (3).

Variações intra-específicas nas diferentes cepas de *T. cruzi* têm sido demonstradas nos níveis morfológico, bioquímico e genético (1, 3, 27, 31, 41). Essa heterogeneidade poderia explicar a variabilidade nas manifestações clínicas da doença de Chagas e as diferenças regionais de sua morbidade (18).

Andrade (1), estudando o comportamento biológico de cepas de *T. cruzi* e seus perfis histopatológicos em animais experimentais, classificou os isolados em três tipos ou biotemas.

Diferenças isoenzimáticas entre isolados do parasito foram inicialmente demonstradas por Toyé (42) em 1974 e confirmadas por Miles et al. (28) em 1980, os quais propuseram a divisão das diferentes cepas em três zimodemas principais: Z1, Z2 e Z3. Esses zimodemas apresentam diferentes distribuição e associação hospedeiro-vetor e sua distribuição geográfica pode estar associada às diversas formas clínicas da doença de Chagas (23, 29).

Em 1997, Andrade e Magalhães (4), realizando estudo biológico e isoenzimático, confirmaram a relação existente entre os biotemas e zimodemas das cepas encontradas em diferentes regiões geográficas.

Souto et al. (40), estudando o gene que codifica o RNA ribossomal e o gene de minixon de cepas e clones do protozoário oriundas de diversas regiões, propuseram a divisão de *T. cruzi* em duas linhagens filogenéticas principais: linhagens 1 e 2. A linhagem 1 é constituída de *T. cruzi* isolado do ciclo doméstico e a linhagem 2 é preferencialmente encontrada no ciclo silvestre.

A diversidade de comportamento e morfologia de isolados de *T. cruzi* e a grande diversidade genética dessas cepas impediam uma correlação entre essa diversidade e a complexa epidemiologia e as manifestações clínicas da doença

em virtude da falta de uma nomenclatura comum. Na tentativa de se agrupar os parâmetros morfobiométricos e as características moleculares de diferentes linhagens de *T. cruzi*, as cepas foram agrupadas em dois grupos principais denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Essa denominação surgiu de um consenso entre especialistas que propuseram a unificação de várias classificações baseadas em diferentes marcadores (5).

A caracterização das diferentes cepas existentes em uma determinada área geográfica é crucial para o estudo do papel da diversidade do parasito na patogênese local da doença de Chagas. É provável que o predomínio de um dado tipo de cepa em uma determinada área esteja relacionado com as principais manifestações da doença naquela área. Considerando os vários aspectos da infecção por *T. cruzi*, a presença do mesmo padrão biológico e bioquímico de cepa em uma área endêmica poderia ser importante, não somente para observação do tipo predominante de manifestações clínicas e envolvimento de órgãos, mas também em relação à resposta à quimioterapia, já que se sabe que cepas de diferentes biotipos mostram suscetibilidade diferente às drogas disponíveis para tratamento da doença (1, 3).

Assim, o objetivo desse estudo foi caracterizar quatro cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes humanos na região de Araraquara, São Paulo, sob os aspectos biológico e molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de *T. cruzi*

Foram caracterizadas quatro cepas de *T. cruzi*, isoladas de pacientes adultos, portadores de cardiopatia chagásica crônica comprovada clínica e sorologicamente. As cepas designadas AMJM, BFS, NBR e NCS foram isoladas por xenodiagnóstico no Laboratório de Parasitologia da UNESP de Araraquara-SP e estão sendo mantidas em laboratório por meio de passagens sucessivas em camundongos desde 1986 (12). De acordo com o código internacional para designação de isolados de *T. cruzi* (43), as cepas estudadas foram assim denominadas: MHOM/BR/86/LPFCF-UNESP04AMJM, MHOM/BR/86/LPFCF-UNESP09BFS, MHOM/BR/86/LPFCF-UNESP13NBR, MHOM/BR/86/LPFCF-UNESP15NCS.

Caracterização biológica

Período pré-patente e curva parasitêmica

Para cada cepa, sete camundongos *Swiss*, machos, pesando entre 10g e 12g foram inoculados intraperitonealmente com sangue citratado proveniente de outros camundongos previamente infectados. O inóculo foi de aproximadamente 5×10^3 formas tripomastigotas sangüíneas para as cepas AMJM, BFS e NCS e 2×10^3 formas tripomastigotas para a cepa NBR. A pesquisa das formas tripomastigotas

na corrente sangüínea foi feita diariamente a partir do segundo dia de infecção até a observação dos parasitos e, em seguida, em intervalos de dois dias, com término da observação no 60º dia. A contagem foi realizada em 5 µL de sangue coletado da cauda do animal, seguindo a técnica de Brener (7). Foram contados 100 campos microscópicos com aumento de 400 vezes. O número de formas tripomastigotas contadas foi multiplicado por uma constante que depende do microscópio, da ocular e da objetiva utilizados. Para obtenção da constante referida, utilizou-se o método descrito por Martins (25). Foi estabelecida uma média aritmética do número das formas sangüíneas observadas nos sete camundongos em cada dia de contagem e traçada uma curva parasitêmica. Esta metodologia foi repetida para cada cepa em três grupos de camundongos. Os valores médios obtidos para cada dia de observação da parasitemia, nos três grupos de camundongos, foram submetidos à Análise de Variância para verificação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre eles em um nível de significância de 5%.

A caracterização do grau de parasitemia foi feita de acordo com Devera et al. (18): parasitemia elevada – picos parasitêmicos médios maiores que 1.500 parasitos por 5 µL de sangue; parasitemia média – picos parasitêmicos médios entre 500 e 1.499 tripomastigotas por 5 µL de sangue; baixa parasitemia - picos parasitêmicos médios inferiores a 500 formas sangüíneas por 5 µL de sangue.

Taxa de mortalidade

Foi feita diariamente a observação do número de animais que morriam durante o curso da infecção, fazendo-se a porcentagem em relação ao número total após exclusão dos sacrificados.

Morfologia dos parasitos no sangue periférico

A morfologia das formas parasitárias foi estabelecida em esfregaços realizados em intervalos de quatro dias durante a fase aguda da infecção. Para cada dia, dois ou três animais infectados foram selecionados ao acaso. Com sangue coletado da cauda do animal foram confeccionados esfregaços que, após secagem e fixação pelo metanol foram corados pelo Giemsa e observados ao microscópio com aumento de 1.000 vezes. Foram procurados 50 parasitos por lâmina ou examinado todo o esfregaço nos casos de parasitemia baixa. Os critérios descritos por Brener e Chiari (8) foram usados para caracterizar as formas delgadas, largas e muito largas do parasito.

Estudo histopatológico

Para o estudo histopatológico, foram sacrificados, para cada cepa, 21 animais infectados, sendo 3 em cada um dos seguintes dias de infecção: 7º, 10º, 14º, 20º e 30º para o estudo da fase aguda e 150º e 180º para o estudo da fase crônica. Dos animais sacrificados foram retirados fragmentos dos seguintes órgãos: coração, músculos esqueléticos (músculos abdominais), intestino grosso, fígado e baço. Esses fragmentos foram mantidos em formol a 10% por 10 dias. Após

lavagem por 12 horas em água corrente, as peças foram submetidas aos processos de desidratação e diafanização para inclusão em parafina. Seções de 5 µm de cada peça foram cortadas em micrótomo, estendidas em lâminas e coradas por hematoxilina-eosina, segundo a técnica de Ramos modificada por Nai et al. (33). Os cortes foram examinados ao microscópio em toda a sua extensão, determinando-se a presença do parasito (parasitismo tecidual) e de reações inflamatórias.

Os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UNESP – Araraquara-SP.

Tipagem Molecular

Extração do DNA

Formas epimastigotas foram obtidas pelo crescimento do parasito em meio LIT (liver infusion tryptose) a 28° C por três semanas. Aproximadamente 5 mL da cultura foi centrifugada a 700 x g por 20 minutos a 4° C. O sedimento obtido foi ressuspenso em PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) e centrifugado a 700 x g por dez minutos a 4° C. Esse procedimento foi repetido por três vezes.

A lise dos parasitos foi realizada pela adição de 1 mL de uma solução de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) e incubação a 56° C por duas horas com 100 µg/mL de proteinase K e dodecilsulfato de sódio (SDS) a 0,5% de concentração final.

A amostra foi separada em dois tubos Eppendorf®, sendo adicionado a cada tubo igual volume de fenol estabilizado. Após centrifugação a 15.000 x g por três minutos, a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo Eppendorf® e foram realizadas três extrações com igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e três extrações com igual volume de clorofórmio. Com uma nova centrifugação a 15.000 x g por três minutos, recuperou-se a fase aquosa que recebeu a adição de duas vezes o volume de etanol absoluto e 10% do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2. A solução foi deixada em temperatura ambiente por 15 minutos e após nova centrifugação a 15.000 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado pela adição de 500 µL de álcool etílico a 70%. Após nova centrifugação a 15.000 x g por cinco minutos o sobrenadante foi desprezado e o DNA foi ressuspenso em 50 µL de TE.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Parte do espaçador não transcrito do gene de minixon foi amplificado por PCR pela técnica do “PCR multiplex” descrita por Fernandes et al. (21). Para obter a amplificação foram utilizados como *primers* um *pool* de cinco oligonucleotídeos: 5'-ACACTTTCTGTGGCGCTGATCG-3' (TC1 - específico para o grupo I); 5'-TTGCTCGCACACTCGGCTGCAT-3' (TC2 - específico para o grupo II); 5'-CCGCGWACAACCCCTMATAAAAATG-3' (TC3 - específico para Z3);

5'-CCTATTGTGATCCCCATCTTCG-3' (TR - específico para *Trypanosoma rangeli*) e 5'-TACCAATATAGTACAGAACTG-3' (ME - comum a todos os grupos).

Reação continha 100 pmol de cada *primer*, 100 µM de cada deoxinucleotídeo na seguinte solução: Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 0,1 mg/mL de soroalbumina bovina e 2,5 Unidades de Amplitaq Gold™ DNA Polimerase (Cetus, Perkin Elmer). Aproximadamente 10 ng de DNA genômico foram adicionados a essa mistura que foi levada a um volume final de 50 µL com água Milli Q.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer®) com o seguinte perfil térmico: 95°C por um minuto para ativação da enzima e 35 ciclos, incluindo desnaturação a 94°C (30 segundos), anelamento a 55°C (30 segundos) e extensão a 72°C (30 segundos), com uma extensão final durante dez minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5% em TBE 1X (0,09 M Tris-Borato, pH 8,0 e 0,002 M EDTA pH 8,0), corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com câmara Polaroid®.

Produtos de amplificação com 200 pb caracterizam *T. cruzi* I, 250 pb caracterizam *T. cruzi* II e 150 pb caracterizam cepas classificadas como *T. cruzi* zimodema 3.

RESULTADOS

Caracterização biológica

Evolução da parasitemia

A cepa NBR apresentou parasitemia subpatente durante todo o curso da infecção. O comportamento de cada cepa nos diferentes grupos de camundongos manteve-se relativamente constante, observando-se uma ascensão lenta e regular da parasitemia até atingir um pico e depois queda também regular até desaparecimento dos parasitos do sangue periférico. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para um nível de significância de 5%, nos níveis médios de parasitemia observados nos três grupos de camundongos infectados com cada cepa estudada. Os valores referentes ao período pré-patente, aos níveis médios de parasitemia e à duração da fase aguda, observados nos três grupos de camundongos infectados para cada cepa, podem ser observados na Tabela 1.

Todos os camundongos infectados com as quatro cepas sobreviveram e evoluíram para a fase crônica.

Taxa de mortalidade

A infecção com as quatro cepas não determinou mortalidade dos camundongos até 180 dias após serem inoculados.

Tabela 1. Características biológicas de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos em Araraquara, São Paulo

Cepa	Grupo de camundongo	PPP (dias)	Pico de parasitemia		Duração da fase aguda	
			n°/100 campos ¹	n°/5 μ L ²	dias	(dias)
AMJM	1°	5	8	237	21	39
	2°	9	12	330	21	43
	3°	6	10	285	18	38
BFS	1°	8	10	281	22	42
	2°	7	9	265	21	39
	3°	9	10	281	19	43
NCS	1°	5	14	406	19	37
	2°	8	19	523	18	40
	3°	7	16	438	23	43
NBR	1°	ND	SP	SP	ND	ND
	2°	ND	SP	SP	ND	ND
	3°	ND	SP	SP	ND	ND

¹média do número de formas tripomastigotas/100 campos microscópicos com aumento de 400x; ²média do número de formas tripomastigotas/5 μ L de sangue de sete camundongos infectados; PPP = período pré-patente; ND = não determinado; SP = sub-patente.

Morfologia dos tripomastigotas sanguíneos

Nas cepas que apresentaram parasitemia patente (AMJM, BFS e NCS) foram observadas apenas formas sanguíneas largas durante todo o curso da infecção.

Estudo histopatológico

Os dados referentes aos achados histopatológicos nos órgãos analisados podem ser observados na Tabela 2.

Cepa AMJM – Durante a fase aguda foram observados parasitos e reação inflamatória moderada no músculo cardíaco e reação inflamatória discreta nos músculos esqueléticos. Na fase crônica observou-se reação inflamatória discreta no músculo cardíaco e nos músculos esqueléticos e moderada no fígado.

Cepa BFS – Foi observada reação inflamatória discreta no músculo cardíaco e moderada nos músculos da parede intestinal, nos plexos mioentéricos e nos músculos esqueléticos durante a fase aguda da infecção. Na fase crônica foi observada reação inflamatória discreta no músculo cardíaco e moderada em gânglios nervosos cardíacos. Não foram observadas formas amastigotas nos tecidos analisados.

Cepa NBR – Observou-se reação inflamatória discreta no músculo e nos gânglios nervosos cardíacos durante a fase aguda; na fase crônica, foram observados parasitos no músculo cardíaco e reação inflamatória moderada no fígado.

Cepa NCS – Durante a fase aguda foi observada discreta reação inflamatória no músculo e gânglios nervosos cardíacos e nos músculos esqueléticos. Na fase crônica foi observada discreta reação inflamatória no músculo cardíaco. Não foi observado parasitismo tecidual na fase aguda nem na fase crônica da infecção.

Tabela 2. Achados histopatológicos em coração, músculos esqueléticos, fígado, baço e intestino de camundongos infectados com quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos

Cepa	Achado histológico	Órgão									
		coração		intestino		músculo esquelético		fígado		baço	
		f.a.	f.c.	f.a.	f.c.	f.a.	f.c.	f.a.	f.c.	f.a.	f.c.
AMJM	Parasitas	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflamação	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
BFS	Parasitas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflamação	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
NBR	Parasitas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflamação	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NCS	Parasitas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflamação	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

f.a. = fase aguda; f.c. = fase crônica; (+) = presença de parasitos ou de inflamação; (-) = ausência de parasitos ou de inflamação.

Caracterização biológica das cepas

Com base nos dados obtidos, todas as cepas foram caracterizadas no Biodema Tipo II.

Tipagem Molecular

As quatro cepas foram caracterizadas por meio da amplificação de um segmento do espaçador não transcrito do gene de minixon. Para todas as cepas foi amplificado um fragmento com 250 pb, correspondente a *T. cruzi* II. (Figura 1).

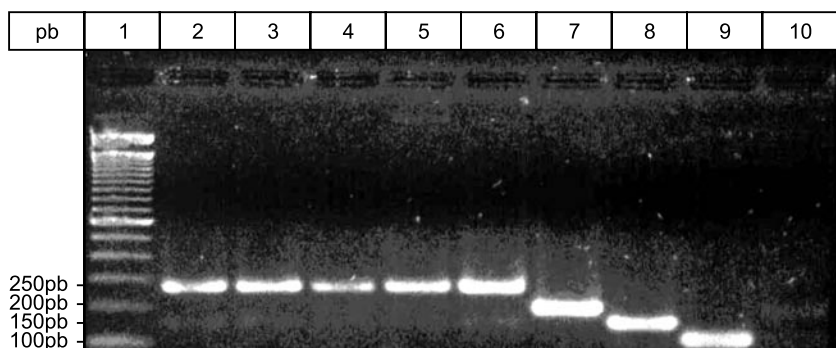


Figura 1. Produto da amplificação do gene mini-exon. 1 – marcador de peso molecular ladder 100 DNA®; 2 – cepa AMJM; 3 – cepa NBR; 4 – cepa NCS; 5 – cepa BFS; 6 – cepa padrão *T. cruzi* II; 7 – cepa padrão *T. cruzi* I; 8 – cepa padrão *T. cruzi* Z3; 9 – *T. rangeli*; 10 – controle negativo.

DISCUSSÃO

As cepas estudadas foram isoladas, em 1986, de pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica comprovada clínica e sorologicamente. Esses pacientes eram provenientes de várias regiões e, no momento do isolamento das cepas, residiam na região de Araraquara – SP. Informações referentes às regiões de origem dos pacientes, aspectos clínicos da doença e dados pessoais dos pacientes não puderam ser recuperadas.

A multiplicação das três cepas foi relativamente lenta com baixa parasitemia e ausência de mortalidade dos animais infectados. Esses dados estão de acordo com as observações de Fernandes et al. (20) e Oliveira et al. (34), cujos relatos dão conta de que em pacientes chagásicos crônicos há uma predominância de cepas de baixa virulência para camundongos

Em um estudo prévio realizado por Rosa et al. (38) em 1987, foram observadas parasitemias médias de 10 formas tripomastigotas/100 campos microscópicos para a cepa AMJM, 5 formas parasitárias/100 campos microscópicos para a cepa BFS, 6 formas tripomastigotas/100 campos para a cepa NBR e 35 parasitos/100 campos para a cepa NCS. Quando comparamos os dados referentes ao número de parasitos/100 campos microscópicos observados nesse estudo (Tabela I), observamos que houve diminuição da parasitemia para as cepas NCS e NBR, aumento da parasitemia para a cepa BFS e manutenção dos níveis parasitêmicos para a cepa AMJM.

Transformações no comportamento biológico de cepas de *T. cruzi* podem ocorrer durante a realização de repiques sucessivos em camundongos, onde as condições de manutenção do laboratório agiriam como meio selecionador (15). Essas mudanças foram descritas por vários autores e o aspecto mais freqüentemente observado foi o aumento da virulência (8, 9, 13). Entretanto têm sido também observadas a preservação (14) e a atenuação da virulência (1, 26).

A diminuição da parasitemia da cepa NBR pode ser uma característica intrínseca da cepa, mas pode também estar relacionada ao pequeno inóculo, já que Andrade (1) observou uma correlação direta da virulência com o número de parasitos inoculados. Entretanto, outros autores não puderam observar tal relação (8, 15). Dessa forma, estudos posteriores serão realizados para testar essa hipótese.

O exame histopatológico mostrou miotropismo com envolvimento predominante do miocárdio, já que formas parasitárias foram observadas no músculo cardíaco de animais infectados com as cepas AMJM na fase aguda e NBR na fase crônica da infecção e reação inflamatória foi observada no músculo cardíaco de animais infectados com todas as cepas (Tabela II).

Para a cepa NBR, apesar do pequeno inóculo e da parasitemia subpatente, foram observados parasitos no músculo cardíaco. Essa observação está de acordo com Andrade (1, 3), segundo o qual a patogenicidade é uma característica constante e independe do inóculo.

A classificação biológica das cepas foi feita de acordo com os critérios estabelecidos por Andrade (1), tendo como parâmetros os níveis de parasitemia, morfologia das formas tripomastigotas sanguíneas, taxa de mortalidade dos animais infectados e tropismo tissular. As cepas estudadas apresentaram baixa parasitemia e ausência de mortalidade dos animais infectados. Desse modo, de acordo com Andrade (1), podem ser classificadas no Biodema Tipo II, de baixa virulência. A cepa NBR apresentou parasitemia subpatente e, segundo De Sousa (17), cepas que não apresentam parasitemia patente não podem ser classificadas de acordo com os critérios estabelecidos por Andrade (1). Mas, apesar disso, classificamos essa cepa no Biodema Tipo II, tomando por base, principalmente, o miocardiotropismo, a baixa parasitemia (subpatente) e a ausência de mortalidade dos animais infectados.

Sabendo-se que o número de formas inoculadas no animal experimental pode interferir nos níveis de parasitemia, é necessário que se estabeleçam inóculos padrões para a determinação dos níveis de parasitemia. Na literatura consultada, vários autores utilizaram inóculos variando de 50 a 150.000 formas parasitárias (9, 13, 14, 15, 18, 20, 26). É necessário também uniformizar os critérios de patogenicidade e virulência. Diferentes autores utilizam índices de parasitemia médios bastante variáveis para a classificação dos níveis baixo, médio e alto de virulência (1, 13, 15, 18, 20).

A tipagem molecular das cepas foi feita por meio da amplificação de um segmento do espaçador não transcrito do gene de minixon, utilizando PCR multiplex. Para todas as amostras foi amplificado um fragmento com 250 pb (Figura 1), sendo todas as cepas classificadas como *T. cruzi* II. Essa observação está de acordo com os dados obtidos por Zingales et al. (44), os quais relataram que *T. cruzi* II é altamente prevalente em infecções humanas no Brasil.

Apesar das quatro cepas serem caracterizadas como *T. cruzi* II, observou-se uma variabilidade biológica entre elas, já que três cepas (AMJM, BFS e NCS) apresentaram parasitemia patente e uma cepa (NBR) apresentou parasitemia subpatente. Estudos prévios têm mostrado que *T. cruzi* II pode se subdividir em cinco subpopulações denominadas *T. cruzi* IIa, IIb, IIc, IId e IIe (10, 11). Estes subgrupos parecem estar associados a diferentes vetores e reservatórios. É possível que pelo menos a cepa NBR apresente características moleculares diferente das demais. No momento nós estamos empenhados em conseguir um crescimento suficiente da cepa NBR, já que essa cepa apresenta um crescimento irregular e difícil, tanto *in vitro* como *in vivo*, para que possamos testar essa hipótese num trabalho futuro.

Com base nos dados obtidos concluímos que o presente trabalho demonstra uma correlação entre os resultados das classificações biológica e molecular, confirmando as recomendações do Satellite Meeting (5).

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Arnaldo Buainain, Francisco Miguel Belda Neto, Arlete Scarsolo Martini e João Flávio Giuzzi da UNESP de Araraquara - SP pelo isolamento das cepas; a Maria Zenaide Tita Fernandes e Isabel Martinez da UNESP de Araraquara - SP pela manutenção das cepas; ao Dr. Octávio Fernandes e a Patrícia Cuervo da FIOCRUZ - RJ pela orientação na realização das análises moleculares.

ABSTRACT

Biological and molecular characterization of four *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients in chronic phase, cardiac form of Chagas disease.

Four *Trypanosoma cruzi* strains, isolated from chronic chagasic patients, originating from several geographic areas, residents in Araraquara region, São Paulo, Southeast Brazil, were analyzed using biological and molecular methods. The strains were named AMJM, BFS, NBR and NCS. In order to study the biological behavior of *Trypanosoma cruzi* strains, three groups of albino *Swiss* mice, weighting 10-12g, were intraperitoneally inoculated with bloodstream forms of the studied strains. Pre-patent period, patterns of parasitaemia, morphology of tripomastigote forms, mortality rate and tissue distribution of the protozoan were analyzed. Three strains showed patent parasitaemia with variable pre-patent period, low parasitaemia and broad forms during the whole period of the infection. One strain showed sub-patent parasitaemia. Mortality rates were null. Histopathological analysis showed amastigotes forms in the cardiac muscle of animals inoculated with strains AMJM and NBR and inflammatory process, varying from discreet to moderate in cardiac muscle for all four strains, in colon for BFS strain, in skeletal muscle for AMJM, BFS and NCS strains and in liver for AMJM and NBR strains. Biological parameters allowed the characterization of all four strains in Biodeme Type II. For the molecular characterization, the parasite DNA was extracted from epimastigotes forms cultured in LIT medium. Part of the non-transcribed spacer of the mini-exon gene was amplified by PCR. Amplicons with 250 pb were observed for all four strains. The molecular and biological characteristics allowed the typing of all the strains as *T. cruzi* II.

KEY WORDS: *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Strains. Biodeme. PCR multiplex. *T. cruzi* II.

REFERÊNCIAS

1. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop* 3 : 65-121, 1974.
2. Andrade ZA. Patologia da doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 201-230.
3. Andrade SG. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras Med Trop* 18 (Suppl.): 39-46, 1985.
4. Andrade SG, Magalhães JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 27-35, 1997.
5. Anonymus. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl I): 429-432, 1999.
6. Araújo FG, Remington JS. Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. *J Immunol* 127 : 855-859, 1981.

7. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 4: 389-396, 1962.
8. Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 5: 220-224, 1963.
9. Brener Z, Chiari E, Alvarenga NJ. Observations of *Trypanosoma cruzi* strains maintained over 8-years period in experimentally inoculated mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 16: 39-46, 1974.
10. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 30: 35-44, 2000.
11. Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 31: 1218-1226, 2001.
12. Buainain A, Belda Neto FM, Giazzi JF, Rosa JA, Martini AS. Isolamento e caracterização de amostras de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos crônicos residentes na região de Araraquara – SP. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82 (Suppl 1): 54, 1987.
13. Camandaroba ELP, Campos RF, Magalhães JB, Andrade SG. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biode Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 151-157, 2001.
14. Campos MF, Andrade SG. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 795-800, 1996.
15. Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 387-393, 1991.
16. Coura JR, Ferreira LF, Rubens J, Pereira NC, Silva JR. *Trypanosoma* do “complexo cruzi” em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 8: 125-133, 1966.
17. De Sousa MA. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi*, Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1): 205-210, 1999.
18. Devera R, Illarramendi X, Montoya-Araújo R, Pirmez C, Fernandes O, Coura JR. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 323-330, 2002.
19. Dias JCP, Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(Suppl 1): 103-121, 1999.
20. Fernandes CD, Murta SMF, Cerávolo IP, Krug LP, Vidigal PG, Steindel M, Nardi N, Romanha AJ. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 343-351, 1997.
21. Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 97-99, 2001.
22. Lopes ER, Chapadeiro E. Anatomia patológica da doença de Chagas humana. In: Dias JCP, Coura JR. *Clínica e Terapêutica da doença de Chagas*. Uma abordagem prática para o Clínico Geral. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. p.67-84.
23. Luquetti AO, Miles MA, Rassi A, Rezende JM, Souza AA, Povoá MM, Rodrigues I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas’ disease in central Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 462-470, 1986.
24. Marim RG. Definição de parâmetros epidemiológicos e parasitológicos da doença de Chagas em Santander – Colômbia, e características de seu agente etiológico. 2003. 154 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.
25. Martins LPA. Verificação da susceptibilidade de três espécies Triatominae (Hemiptera Reduvidae) à infecção por duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando

- xenodiagnóstico artificial. 1999. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999
26. Martins LPA, Castanho REP, Rosa JA, Silva LC, Godoy CAP, Rosa RM. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa de *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 35-39, 2003.
 27. Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 217-225, 1977.
 28. Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Povoá M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 221-237, 1980.
 29. Miles MA, Apt W, Widmer G, Póvoa MM, Schofield CJ. Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 526-535, 1984.
 30. Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 577-591, 2003
 31. Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Nat Acad Sci USA* 77: 6810-6814, 1980.
 32. Morel CM, Deane MP, Gonçalves AM. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitology Today* 2: 97-100, 1986.
 33. Nai GA, Ferro L, Galle LC, Quatrochi PJ, Giroto LA. Procedimentos de coloração dos preparados cito e histológicos – uma nova proposta. *Laes & Haes* 147: 123-128, 2004.
 34. Oliveira EC, Stefani MM, Campos DE, Andrade AL, Silva SA, Rassi A, Luquetti AO. *Trypanosoma cruzi* stocks isolated from acute Chagas disease patients lead to lethal murine infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 25-27, 1997.
 35. Prata A. Chagas' heart disease. *Cardiology* 52: 79-96, 1968.
 36. Ribeiro ALP, Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 301-314, 1998.
 37. Rocha A, De Menezes AC, Da Silva AM, Ferreira MS, Nishioka AS, Burgarelli MK, Almeida E, Turcato JG, Metzke K, Lopes ER. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 50: 261-268, 1994.
 38. Rosa JA, Belda Neto FM, Buainain A, Giuzzi JF, Martini AS, Cunha Filho C, Ribeiro CA. Características de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de chagásicos crônicos. In: Jornada Farmacêutica da Unesp, 34, Araraquara. *Resumos...* p.18, 1987.
 39. Soares MBP, Santos RR. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(Suppl. I): 257-262, 1999.
 40. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152, 1996.
 41. Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJG. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 60: 71-80, 1993.
 42. Toyé PJ. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68: 147, 1974.
 43. World Health Organization. Control of Chagas Disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva. *WHO Technical Report Series*, 905, 2002.
 44. Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen AM, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Intern J Parasitol* 28: 105-112, 1998.