

**ESTUDO DA INFECTIVIDADE DA CEPA "Y" DE *Trypanosoma cruzi*,
MANTIDA POR LONGO PERÍODO EM MEIO DE CULTURA, APÓS
PASSAGEM EM TRIATOMÍNEOS *.**

*Carlos Augusto Lopes Barbosa ***

RESUMO

A cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi*, mantida por mais de vinte anos em meio de cultura (LIT) em nosso laboratório, tornou-se não virulenta para hospedeiros sensíveis (0,1ml/1 x 10⁽¹⁰⁾ tripanossomas/ml, via intraperitoneal/camundongos Balb-C).

Com a finalidade de se verificar uma possível alteração da infectividade desta cepa após passagem em triatomíneos, foi feito xenodiagnóstico artificial, quando se utilizou 25 triatomíneos da espécie *Dipetalogaster maximus* (1º estágio), 25 *Triatoma matogrossensis* (4º e 5º estágio) e 30 *Rhodnius neglectus* (5º estágio), os quais se alimentaram no aparelho de xenodiagnóstico artificial contendo 20 ml de meio LIT com 1,5 x 10⁽¹⁰⁾ tripanossomas/ml da cepa "Y" mais 10 ml de sangue humano heparinizado.

A primeira leitura, feita com 30 dias, foi positiva em 40% dos triatomíneos, enquanto que, com 60 dias, a positividade foi de 95% dos triatomíneos. Nesta ocasião, foi feito um "pool" de fezes e urina de todos os triatomíneos, obtendo-se um volume de 8ml de material contendo 1,1 x 10⁽⁷⁾ formas/ml, cuja concentração foi inoculada, volume de 0,4ml, por via intraperitoneal, em 20 camundongos da linhagem Balb-C. Animais do grupo controle também receberam o inóculo no mesmo volume, concentração e via, da cepa "Y" proveniente de meio de cultura (LIT).

Ambos os grupos de camundongos obtiveram os mesmos resultados, onde a parasitemia verificada, por 30 dias após o inóculo, permaneceu negativa, não houve mortalidade dentro do período de 120 dias e o estudo anatomopatológico (coração, baço, fígado, musculatura do quadríceps) realizado com 30 e 120 dias, após o inóculo, não revelou a

* Trabalho apresentado à Coordenação do Curso de Especialização em Parasitologia para obtenção do título de Especialista em Parasitologia. Orientador: Prof. Ionizete Garcia da Silva. Parcialmente financiado pelo CNPq.

** Bolsista do CNPq.

BARBOSA, C. A. L. Estudo da infectividade da cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* mantida por longo período em meio de cultura, após passagem em triatomíneos. Rev. Pat. Trop. 18(2):159-165, jul./dez. 1989

presença de amastigotas e nem processo inflamatório em nenhum dos órgãos. Concluindo que não houve alteração da infectividade desta cepa após uma passagem em triatomíneos.

UNITERMOS: *T. cruzi*, Triatomíneos, *D. maximus*, *T. matogrossensis*, *R. neglectus*.

INTRODUÇÃO

No ciclo de vida do *T. cruzi* existem formas capazes de se diferenciarem e uma, considerada altamente diferenciada, responsável pela infectividade deste protozoário, que não se divide. O ciclo biológico inicia-se quando o hospedeiro invertebrado (Hemiptera, Reduviidae) exerce a hematofagia no hospedeiro vertebrado. Durante a alimentação, as formas tripomastigotas sanguíneas do hospedeiro vertebrado infectado são ingeridas pelo inseto. Após um período de reprodução no seu trato intestinal, observam-se formas tripomastigotas metacíclicas (infectantes) na ampola retal que são eliminadas nas fezes e na urina⁽⁴⁾.

Tanto as formas tripomastigotas sanguíneas quanto as derivadas de triatomíneos podem ser cultivadas "in vitro". Utilizando-se meios de cultura axênicos, como o LIT, à temperatura de 28°C, obtêm-se epimastigotas, que são capazes de se reproduzirem e, sob condições normais, uma pequena e variável porcentagem dessas formas (+/- 25%) transforma-se em tripomastigotas durante a fase estacionária^(8,9,11). No entanto, várias manipulações das condições de cultura podem modificar a proporção dessas formas^(2,3,10,12,16).

Têm-se observado que a manutenção de cepas de *T. cruzi* em meio

de cultura por longo período leva à diminuição de sua infectividade para hospedeiros vertebrados^(1,13).

A cepa "Y" de *T. cruzi* utilizada foi mantida por 20 anos em meio de cultura (LIT), através de repiques quinzenais, perdendo totalmente a capacidade de infectar hospedeiros sensíveis (camundongos da linhagem Balb-C), mesmo após a inoculação de altas doses dessas formas de cultura, por via intraperitoneal⁽¹⁾.

A mudança de comportamento dessa cepa decorre, provavelmente, de alterações metabólicas ocorridas em função do longo afastamento do parasita de seus hospedeiros naturais ou mesmo de animais de laboratório. Admite-se que variações biológicas e de natureza bioquímica ocorridas com o *T. cruzi* desenvolvem-se, permanentemente e evolutivamente, em função de mutações na dependência da interação entre o parasita e os componentes do meio em que ele vive^(1,7).

Tendo em vista que, na natureza, as formas infectantes do *T. cruzi*, para hospedeiros vertebrados, são obtidas nos excrementos dos triatomíneos e que, essas formas têm especificidades antigênicas adicionais quando comparadas com as correspondentes formas de cultura⁽¹⁵⁾, este trabalho tem a finalidade de verificar uma possível alteração da infectividade desta cepa, após passagem em triatomíneos.

BARBOSA, C. A. L. Estudo da infectividade da cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* mantida por longo período em meio de cultura, após passagem em triatomíneos. Rev. Pat. Trop. 18(2):159-165, jul./dez. 1989

MATERIAL E MÉTODOS

CAMUNDONGOS E CEPAS "Y": foram utilizados 40 camundongos da linhagem Balb-C, fêmeas com cerca de 5 semanas de vida, criados no biotério da Unidade de Investigação Gaspar Viana - Departamento de Medicina Tropical - IPTSP - UFG. A Cepa "Y", proveniente do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, mantida no meio de cultura (LIT), por mais de 20 anos, através de repiques quinzenais, no laboratório da mesma unidade.

XENODIAGNÓSTICO ARTIFICIAL: utilizou-se um grupo de 25 triatomíneos da espécie *D. maximus* (1º estágio); 25 *T. matogrossensis* (4º e 5º estágios) e 30 *R. neglectus* (5º estágio) procedentes do laboratório de Biologia e Fisiologia de triatomíneos - Departamento de Parasitologia IPTSP-UFG, para a alimentação no aparelho de xenodiagnóstico artificial composto de um dispositivo de 2 câmaras de vidro, uma externa com água a 37°C em movimento e uma interna contendo a cepa de *T. cruzi* em meio LIT mais sangue heparinizado. A concentração da cepa foi de $1,5 \times 10^{10}$ tripanosomas/ml, junto ao sangue humano heparinizado, tinha o volume de 30ml. Os triatomíneos, após ingurgitamento completo, foram mantidos em estufa a 30°C, com fotoperíodo de 12h e umidade de 70 +/- 5%, durante um período de 30 e 60 dias, para 1ª e 2ª leituras, respectivamente.

LEITURA DO XENODIAGNÓSTICO/INOCULAÇÃO: a leitura foi feita segundo método das dejeções espontâneas com auxílio de microplaca de fundo plano e microscópio de inversão^(6,14). A determinação do número de formas de *T. cruzi* foi feita com 5µl entre lâmina e lamínula⁽⁵⁾. Após a leitura e a determinação do número de formas tripomastigotas metacíclicas foi feita a inoculação em camundongos por via intraperitoneal.

DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA/ÍNDICE DE MORTALIDADE: a parasitemia foi verificada em intervalos de 2 em 2 dias, por um período de 30 dias, através do sangue (5µl) colhido na cauda, após corte, colocado entre lâmina e lamínula para contagem em microscópio ótico simples⁽⁵⁾. O índice de mortalidade foi verificado durante 120 dias a partir da data do inóculo.

HISTOPATOLOGIA: os órgãos (coração, fígado, baço e musculatura do quadríceps) foram retirados, fixados em formol tamponado a 10%, incluídos em parafina e feitos cortes de 5 micrômetros de espessura, corados pela técnica da hematoxilina-eosina para estudo histopatológico. Investigou-se a presença de parasitas, e/ou reações inflamatórias sugestivas de sua atividade, no 30º e 120º dia após a inoculação de formas de *T. cruzi* obtidas de cultura e de triatomíneos.

BARBOSA, C. A. L. Estudo da infectividade da cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* mantida por longo período em meio de cultura, após passagem em triatomíneos. Rev. Pat. Trop. 18(2):159-165, jul./dez. 1989

ESQUEMA/PROTOCOLO EXPERIMENTAL

CEPA Y (LIT) + sangue humano heparinizado
XENODIAGNÓSTICO ARTIFICIAL

25 *D. maximus* (N1)
25 *T. matogrossensis* (N4/N5)
30 *R. neglectus* (N5)

Temp. 30°C
ESTUFA Fotop. 12h
Umid. 79 +/- 5%

1ª leitura (30 dias)
2ª leitura (60 dias)

"Pool" de Fezes/Urina

Determinação do número de formas
Inoculação em camundongos Balb-C
Determinação da parasitemia (30 dias)
Índice de mortalidade (120 dias)
Estudo anatomopatológico (30-120 dias)

RESULTADOS

Verificou-se que a leitura, feita após 30 dias através do método de dejeções espontâneas, mostrou-se positiva em 40% dos triatomíneos, enquanto que, com 60 dias, o índice de positividade foi de 95%. Estes resultados foram corroborados por outros experimentos preliminares, onde utilizamos 2 grupos de triatomíneos, compostos de ninfas e adultos de *D. maximus*, cujas leituras foram efetuadas com 30, 40, 60 e 90 dias após o xenodiagnóstico artificial, ficando evidenciado maior índice de positividade (n^2 de triatomíneos infectados pelo número de formas de *T. cruzi*) aos 60 dias após infecção com o xenodiagnóstico artificial.

Na ocasião da leitura com 60 dias, foi feito o "pool" de fezes e urina de todos os triatomíneos, obtendo-se um volume de 8ml, contendo 1,1 x

10⁽⁷⁾ tripanossomas/ml, cuja concentração foi inoculada, com volume de 0,4ml, por via intraperitoneal, em 20 camundongos Balb-C. A parasitemia permaneceu negativa por todo o período de exame. Não houve mortalidade dentro do período de 120 dias e o estudo anatomopatológico realizado com 30 e 120 dias, após o inóculo, não revelou a presença de amastigotas e nem processo inflamatório em nenhum dos órgãos. Resultado idêntico foi observado com os animais do grupo controle, os quais receberam inóculos da cepa "Y" diretamente da cultura, em iguais volume e concentração de formas.

DISCUSSÃO

Neste trabalho ficou demonstrado a interação biológica entre o triatomíneo e o *Trypanosoma cruzi* da cepa avirulenta visto que, praticamente, 100% dos triatomíneos infectaram-se após o xenodiagnóstico artificial. Verificou-se ainda que, junto a resultados de experimentos preliminares, a leitura feita com 60 dias, após a alimentação em aparelho de xenodiagnóstico artificial, foi a que obteve o mais alto índice de positividade. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao índice de infecção de triatomíneos entre as espécies, *D. maximus*, *T. matogrossensis* e *R. neglectus*, apesar da preferência no uso do *D. maximus*, que apresentou extrema facilidade no manuseio e eliminação de maior quantidade de excrementos.

BARBOSA, C. A. L. Estudo da infectividade da cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* mantida por longo período em meio de cultura, após passagem em triatomíneos. Rev. Pat. Trop. 18(2):159-165, jul./dez. 1989

Entretanto, apesar da manutenção da infectividade entre o hospedeiro invertebrado e esta cepa "Y" de *T. cruzi* mantida por mais de vinte anos em cultura, não houve alteração da infectividade desta cepa para hospedeiros experimentais de alta susceptibilidade. Pois, após uma passagem nos triatomíneos e inoculação desta cepa em hospedeiros sensíveis (Balb-C), não se observou qualquer discrepância, quando comparada com animais do grupo controle e analisada pelos parâmetros de índice de infecção, intensidade de parasitemia, percentual de letalidade e intensidade do parasitismo tissular.

CONCLUSÕES

Não houve alteração da infectividade da cepa "Y" mantida em cultura após uma passagem em triatomíneos, através do xenodiagnóstico artificial. No entanto, houve reprodução do *T. cruzi* em 95% dos triatomíneos. A maior positividade foi na leitura aos 60 dias, após a alimentação, sem apresentar diferenças significativas entre as espécies.

Sugere-se a utilização de *D. maximus* pelas facilidades no manuseio.

SUMMARY

Study of the infectivity of the "Y" strain of *T. cruzi* maintained in

culture, after passage in triatomines.

Y strain of *T. cruzi* kept in LIT for more than 20 years in our laboratory has become non pathogenic when inoculated in Balb-C mice by intraperitoneal route 1 x 10⁽¹⁰⁾ forms, 0,1ml. In order to try to reverse the pathogenicity 25 *D. maximus* (1st stage), 25 *T. matogrossensis* (4th/5th stage) and 30 *R. neglectus* (5th stage) were fed by artificial xenodiagnosis with 20ml of LIT medium containing 1,5 x 10⁽¹⁰⁾ forms/ml of y strain plus 10 ml of human blood. The triatomines were examined after 30 and 60 days when a pool of material (faeces and urine) containing 1,1 x 10⁽⁷⁾ forms/ml was prepared. Twenty Balb-C mice were inoculated with this material by intraperitoneal route and examined every 2 days during 30 days. No parasitemia could be observed during such period or mortality for 120 days.

The histologic study of heart, spleen, liver and quadriceps muscle, done at 30 and 120 days after inoculation, had no evidence of amastigotes or even inflammatory reaction in of studied organs. We obtained the same results in the control group, which was inoculated with y strain from culture, in the same concentration and volume of forms. This indicate that, the present experiment isolated was unable to reverse the infectivity of the strain.

BARBOSA, C. A. L. Estudo da infectividade da cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* mantida por longo período em meio de cultura, após passagem em triatomíneos. Rev. Pat. Trop. 18(2):159-165, jul./dez. 1989

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BARBOSA, C. A. L. Estudo da Infectividade e Imunogenicidade da cepa "Y" de *T. cruzi*, mantida por longo período em meio de cultura. **Revista de Patologia Tropical**, 17(1): 25-39, 1988.
02. BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C.; OLIVEIRA, O. S.; OLIVEIRA, R. L. & MACHADO, F. M. T. *hastatus* - *Tripanosoma* de morcegos *Phyllostomus hastatus hastatus*. Estudo sobre fatores que condicionam "in vitro" modificação de sua forma. **Revista de Patologia Tropical**, 13(3): 409-419, 1984.
03. BARBOSA, W.; BARBOSA, C. A. L. & CZEREWUTA, A. C. Notas sobre a variação do comportamento da patogenicidade e imunogenicidade de cepas de *T. cruzi* variedade *hastatus* e "Y" após longo período de manutenção em cultura. **Revista de Patologia Tropical**, 17(1): 1-8, 1988.
04. BRENER, Z. "New approaches in American Trypanosomiasis" Washington, D. C. Pan American Health Organization, 1976. p. 83-86.
05. BRENER, Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas. Belo Horizonte, 1961, 99p. Tese de Livre Docência. Faculdade de Odontologia e Farmácia de Minas Gerais.
06. BRONFEN, E.; DIAS, S. C. P. & ROCHA, F. S. A. Studies on spontaneous elimination of infectant dejections of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain). In: **Reunião Anual de Pesquisa básica em Doença de Chagas**, 7, Caxambú-MG, 1980.
07. BRUN, R. & SENNI, L. Cultivation of African and South American trypanosomoses of medical and veterinary importance. **British medical bulletin**, 41(2): 123-129, 1985.
08. CAMARGO, E. P. Origin of metacyclic trypanosomoses in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 6: 93-100, 1964.
09. CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V. & FERNANDES, J. F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **Journal of Protozoology**, 14: 447-451, 1967.
10. CARNEIRO, M.; DELAMA, M. & CHIARI, E. Stimulatory effects by "conditioning" cultures medium "TSH" on the transformation from epimastigotes to trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi*. In: **Reunião Anual de Pesquisa básica em Doença de Chagas**, Caxambú-MG, 5, 1978.
11. CHIARI, E. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* culture forms kept in laboratory for different periods of time. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 16: 81-82, 1974.
12. FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, O. & KIMURA, E. Physiological events in the course of the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics supplement**, 61: 213-226, 1969.
13. MENEZES, H. & RIBEIRO, R. The avirulence of the cultured "PF" of *Trypanosoma cruzi*. V the evaluation of parasitologic tests after vaccination of different animal species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 6: 41-48, 1972.
14. SILVA, I. G. da Influência da temperatura na biologia de 18 espécies de triatomíneos

BARBOSA, C. A. L. Estudo da infectividade da cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* mantida por longo período em meio de cultura, após passagem em triatomíneos. Rev. Pat. Trop. 18(2):159-165, jul./dez. 1989

- (Hemiptera Reduviidae) e no xenodiagnóstico. Curitiba, 1985, 388p. Tese de Doutorado. Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná.
15. SIMONE, S. G.; CARVALHO, L. C. P. & GALVÃO-CASTRO, B. Antigenic differences between insect-and culture derived *Trypanosoma cruzi*, metacyclic

trypomastigote extracts. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 37(1): 63-65, 1987.

16. WOOD, D. E. & SOUZA, O. E. *Trypanosoma cruzi* effects of *Rhodnius prolixus* extracts on "in vitro" development. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 18: 93-96, 1976.